

## الفصل الثامن

### أهم أجناس الكائنات الحية الدقيقة المستعملة

### فى المقاومة الحيوية

### أولاً : الأجناس الفطرية

#### I : الجنس *Trichoderma*

#### مقدمة

لقد ذكر الجنس *Trichoderma* منذ أكثر من مائة عام ، وذلك من قبل العالم Per- soon . يتكون هذا الجنس من مجموعة فطريات مترادفة الأسماء ، تعزل من التربة ومن المواد العضوية المتحللة . عزلات هذا الفطر شائعة الانتشار ، ومن السهولة عزلها وتربيتها فى بيئة غذائية . بالإضافة لذلك ، فإن هذه العزلات تنمو بسرعة على كثير من المواد الغذائية المختلفة ، وتنتج مضادات حيوية تكون نتيجة التمثيل الغذائى ، وكذلك فإن هذه العزلات يمكن أن تكون متطفلات على الفطريات الأخرى Mycoparasitic ضد مجال واسع من الكائنات الممرضة .

إن ظاهرة التطفل على الفطريات ، وكذلك إنتاج المضادات الحيوية ، قد ذكرت أول مرة للجنس *Trichoderma* بواسطة Weindling سنة ١٩٣٢ و ١٩٣٤ . هناك تطبيقات تكنولوجية حديثة تستعمل فيها هذه الفطريات كعوامل مقاومة حيوية ، كلها اعتمدت على الأبحاث السابقة التى ذكرها ذاك العالم .

معظم أنواع الجنس *Trichoderma* تنمو بسرعة ، على البيئة الغذائية الصناعية ، وتنتج أعداداً كبيرة من الجراثيم الكونيدية الصغيرة الخضراء أو البيضاء من خلايا تسمى Conidiogenous ، تقع فى نهايات التفرعات العديدة للحوامل الكونيدية . هذه الصفات تسهل نسبياً عملية تعريف وتحديد الجنس *Trichoderma* ، ولكن تحديد الأنواع عملية صعبة جداً ، لأن هناك تداخلاً كبيراً بين صفات هذه الأنواع ، ويصعب وضع الاسم المحدد للنوع إلا بعد دراسة مستفيضة وواسعة .

لقد قسم العالم Aifai سنة ١٩٦٩ هذا الجنس إلى تسعة أنواع ، حددت على أساس الصفات المورفولوجية ، إلا أن العالم Bisset سنة ١٩٩١ أعاد دراسة الجنس *Trichoderma* وأضاف إليه بعض الـ *Hypocrea* ذات الأشكال المتقاربة ، وأدى ذلك إلى تقسيم هذا الجنس إلى خمس مجموعات ، وبالتالي فإن مفهوم الأنواع ضمن هذا الجنس واسع جداً ، وهذا أدى إلى تقسيم الأنواع إلى Specific وآخر Subspecific (هذا ما ذكره Samuels سنة ١٩٩٦) .

من أكثر أنواع الجنس *Trichoderma* تحديداً ومعرفة ، هي :

- 1 - *Trichoderma harzianum*    2 - *T. viride*    3 - *T. hamatum*.  
4 - *T. polysporum*    5 - *T. pseudokoningii*    6 - *T. Koningii*

النوع الثالث والخامس تلائمها التربة عالية الرطوبة ، في حين أن النوع الثاني والرابع تلائمهما التربة ذات الحرارة المنخفضة ، أما النوع الأول يتواجد في المناطق الدافئة ، أما النوع الثالث والسادس فإنهما يتواجدان في ظروف المناخ المتقلب .

### كفاءة الجنس في المقاومة الحيوية :

#### ١ - معاملة تربة

قبل سنة ١٩٧٠ أجريت دراسات كثيرة على المقاومة الحيوية ، وذلك باستعمال الجنس *Trichoderma* على التربة ، وذلك لإحداث تغيرات في التجمعات الطبيعية للكائنات الحية في التربة أو في الأجزاء النباتية المحيطة بها التربة ، مما يؤدي إلى المقاومة الحيوية ، لقد ذكر Bliss سنة ١٩٥١ أن مقاومة الفطر *Armillaria mellea* في الحمضيات بعد التبخير بمادة ثاني كبريت الكربون ، تعزى إلى التجمعات الطبيعية للفطر *Trichoderma* التي تنتشر بسرعة في التربة المعقمة ، ولكنه لم يضع تفسيراً لذلك ، لأن هذه التجمعات تكون هي السبب في مقاومة الكائن الممرض . ولقد ذكر أن الفطر *Trichoderma* ، أكثر مقاومة لمادة ميثايل برومايد من الفطر الممرض *A. mellea* . ثم بعد ذلك ذكر العالم Chet سنة ١٩٨٠-١٩٨١ أن الفطر *T. hamatum* يثبط نمو الفطر الممرض *R. solani* والفطر *Pythium sp.* ثم بعد ذلك حدث تطور كبير في تفهم المقاومة الحيوية .

بدأت المقاومة الحيوية التطبيقية في الحقل ، باستعمال الفطر *Trichoderma* بواسطة

العالم *Well et al.* سنة ١٩٨٢ ، وذلك باستعمال تحضيرات من الفطر تريكوديرما التامى على بيئة صلبة (حبوب ، شيلم أو قمح) وذلك للمقاومة الحقلية للفطر المرض *Sclero-tium rolfsii* على نباتات الطماطم . يحتاج هذا النظام من المقاومة كميات كبيرة من المواد العضوية لينمو عليها الفطر المضاد (٤٢٠٠ كغم/هكتار) لمقاومة المرض . إلا أن العالم *Ka-bana* أستطاع أن يستعمل بعض المواد الحبيبية غير الذائبة (الداياتومات) المخلوطة مع المولاس لتنمية الفطر المضاد *T. harzianum* ، ثم تؤخذ هذه الحبيبات وتضاف على خطوط التربة المزروعة بالفول السوداني ، وهذا يحتاج ١١٢-١٤٠ كغم/هكتار . تنثر هذه المواد بعد الزراعة بحوالى ٧٠-١٠٠ يوم ، وهذا يؤدي إلى مقاومة ناجحة للفطر *S. rolfsii* وأدى إلى زيادة إنتاج الفول السوداني لثلاث سنوات متتالية . ولقد تبين أن مقاومة المرض بهذه الطريقة تعادل مقاومته باستعمال المبيد الفطرى *PCNB* .

عند تنمية الفطر *T. harzianum* على مواد صلبة وتنثر هذه المواد على التربة بالقرب من النباتات المزروعة ، أعطى مقاومة حيوية ناجحة ضد الأمراض الآتية :

- ١ - العفن الأبيض فى البصل المتسبب عن *Sclerotium cepivorum* فى مصر والولايات المتحدة .
- ٢ - أمراض ذبول القطن والخيار المتسببة عن *Verticillium dahliae* فى روسيا .
- ٣ - أمراض سقوط البادرات الرايزوكتونى ولفحة سكلوروشيم فى كثير من المحاصيل فى اسرائيل .
- ٤ - عفن الثمار الرايزوكتونى فى الخيار فى إسرائيل .

لقد ذكر *Kelley* أن إضافة مواد غذائية طازجة ، إلى التربة مع الفطر المضاد *T. harzi-anum* تشجع نمو الفطر المرض *Pythium* وتساعد فى زيادة استعمار المواد العضوية ، وهذا يؤدي إلى زيادة حدوث المرض . لقد تم الحصول على مقاومة تامة للمرض عند إضافة الكائن المضاد على شكل كرات ، قبل زراعة بادرات الخيار المنقولة إلى الأرض الدائمة بحوالى ١٥-٣٠ يوماً .

كذلك يمكن استعمال الجراثيم الكونيدية للفطر *Trichoderma* على شكل معلق تغمر فيه جذور الشتلات الفراولة قبل زراعتها فى الأرض الدائمة ، وهذا يؤدي إلى خفض حدوث الأمراض لهذه الشتلات . كذلك تم الحصول على مقاومة ممتازة لذبول الفيوزاريوم

في الأفحوان سنة ١٩٨٤ ، وذلك بإضافة مزيج من المعلق المائي للجراثيم الكونيدية للفطر *T. viride* مع المبيد الفطري البنليت ، حيث إن هذا البيوتايب الفطري مقاوم للمبيد بنليت . تستعمل جراثيم الفطر المضاد بتركيز ١٠<sup>٤</sup> جرثومة كونيدية/مل ، وتضاف للتربة بعد تبخيرها ببخار الماء على حرارة ٨٢ م° لمدة ساعتين .

أثبتت الدراسات الحديثة بواسطة *Beagle et al* سنة ١٩٨٤ وكذلك العالم *Papavi-zas* سنة ١٩٨٤ ، أن التحضيرات الفطرية الناتجة من التخمرات بكميات كبيرة *Fer- (FB) mentor Biomass* والتي على شكل مسحوق وطين أو كرات من *Alginate* عند إضافتها إلى التربة ، فإنها تتكاثر بسرعة وتثبط المرض بكفاءة أكثر من استعمال الجراثيم الكونيدية العادية أو الجراثيم الكلاميدية . كذلك وجد أن الـ *(FB)* من فطريات *T. viride* و *T. hamatum* و *harzianum* ، تقلل وتثبط بقاء ونمو الفطر الممرض *R. solani* في التربة وتخفض مرض عفن ثمار الطماطم الناتج عن رايزوكتونيا .

## ٢ - معاملة بذور

يعتبر استعمال الفطر *Trichoderma* على البذور ، طريقة بديلة لإدخال الفطر في التربة بدلاً من استعماله مباشرة على التربة في التشكيلات المختلفة المذكورة سابقاً ، حيث إن هذه الطريقة تتطلب كمية قليلة من تحضيرات الفطر ، إذا قيست بالكميات التي توضع في خطوط التربة أو على شكل أكوام صغيرة broadcast .

لقد تم الحصول على مقاومة حيوية جيدة لسقوط البادرات المفاجيء في البسلة والفجل المتسبب عن الفطر *R. solani* والفطر *Pythium* ، وذلك بمعاملة البذور لكل من البسلة والفجل بالجراثيم الكونيدية للفطر *T. hamatum* ، وكذلك تم الحصول على مقاومة جيدة من البيوتايب الناتج من استعمال الأشعة فوق بنفسجية من الفطر *T. harzianum* و *T. viride* . وكذلك حصل تحسن كبير في نمو النباتات وزيادة إنتاج فول الصويا المزروع في تربة ملوثة بالفطر *Rhizoctonia* عند معاملة البذور بالفطر *T. pseudokoningii* ، وكذلك عند معاملة حبوب الذرة وفول الصويا بالفطر *T. harzianum* . إن استعمال الفطر الأخير كمعاملة بذور اللقطن لمقاومة *R. solani* أعطى نتيجة جيدة في الحقل في إسرائيل .

هناك بعض الملاحظات يجب مراعاتها عند استعمال الجنس *Trichoderma* كمعاملة

بذور ، هي :

- ١ - يجب أن يكون الفطر قادراً على التكاثف في التربة .
- ٢ - يجب أن يكون الفطر ذا مقدرة على التنافس في منطقة الرايزوسفير ، وذلك لتثبيط الكائن المرض بالمنافسة أو بالتطفل الفطري أو التضاد الحيوي .
- ٣ - يجب أن يكون الفطر ذا تضاد حيوي ، وله القدرة على التجمع وتكوين مستعمرات في منطقة الرايزوسفير والسيبريموسفير .
- ٤ - يجب ألا يكون حساساً للسايدروفورز المفرزة من البكتيريا والكائنات الدقيقة الأخرى في التربة .
- ٥ - يمكن تحسين كفاءة هذا الجنس عن طريق التنقية والاختيار والهندسة الوراثية والتربية.

### ٣ - الاستعمال على المجموع الخضرى

كانت البداية الأولى في استعمال الفطر *Trichoderma* على المجموع الخضرى ، وذلك عن طريق حقن جروح أشجار القيقب الأحمر بالفطر *T. harzianum* ، وهذا يمنع اختراق الجروح بفطريات الـ *Hymenomycetes* بعد ٢١ يوماً ، ولكن بعد ٢١ شهراً فإن ١٤ ٪ من الجروح المعاملة سببت زيادة في تجمعات هذه الفطريات ، وكان الكائن المضاد أقل فعالية عند استعماله في الشتاء . ونظراً لأن الفطر *Trichoderma* ضعيف في مقدرة على استعمار الخشب الحديث ، فإن تحسن تأثيره يكون بسبب الكميات الكبيرة من اللقاح التى تضاف إلى الجروح ، مما يساعد على تأسيس موقع مؤقت حيث أن سيطرته تفقد مع الزمن .

من الأمثلة الأكثر نجاحاً في المقاومة الحيوية باستعمال الجنس *Trichoderma* على الأجزاء الخضرية في النبات ، هو استعماله للمقاومة الحيوية للأمراض التى تدخل عن طريق الجروح فى الأشجار والشجيرات ، وذلك عن طريق إضافة الفطر إليها وقت التقليم . لقد ذكر Grosclaude سنة ١٩٧٠ أن كفاءة الفطر *T. viride* ضد الفطر *Stereum purpureum* ، مسبب مرض الورقة الفضية على البرقوق ، تكون عالية عند استعماله وقت التقليم . ولقد ابتكر هذا العالم سنة ١٩٧٣ طريقة لاستعمال الجراثيم الكونيدية للفطر المضاد على الجروح أثناء القطع ، عن طريق استعمال مقصات خاصة للتقليم . فى إحدى التجارب العملية وجد أن إضافة الكائن المضاد بهذه الطريقة ، قبل ٤٨ ساعة من الحقن بالكائن المرض يحمى شجرة البرقوق ذات عمر سنتين ، تماماً

من المرض ، ولكن لا يعطى نفس النتيجة إذا استعمل الكائن المضاد مع الكائن الممرض فى نفس الوقت .

لا يقتصر استعمال الفطر *Trichoderma* على منع إبتداء المرض فقط ، ولكن أيضاً يمكن أن تكون هناك معاملات علاجية لمقاومة مرض الورقة الفضية باستعمال الفطر *T. vi-ride* ، حيث يستعمل على أوتاد خشبية ٨,٠ × ١٠ سم توضع فى حفر على مسافات ١٠ سم فى الجذع والأفرع الرئيسية لشجرة البرقوق المصابة بمرض الورقة الفضية ، أو الخوخ أو أشجار النكترين . استعملت هذه الطريقة فى أوائل السبعينيات وأعطت نتائج كالآتى :

١ - ٥٠ ٪ من الأشجار أعطت أعراضاً بسيطة من مرض الورقة الفضية (إختفت الأعراض بعد فترة قصيرة) .

٢ - ٣٣ ٪ لم تعط أية أعراض .

٣ - ١٧ ٪ لم تستجب لهذه المعاملة .

لقد أطلق العالم Ricard سنة ١٩٧٧ اصطلاح Immunizing Commensals على عوامل المقاومة الحيوية ، التى تحدث تأثيرات العلاج الحيوى ، وتحفظ أو تعالج النباتات من المرض دون أن تكون هى ممرضة . لقد كان هناك نجاح تام عند استعمال *T. viride* و *T. polysporum* لمقاومة مرض الورقة الفضية على الأشجار ، وذبول الفيرتسليم على عيش الغراب ، وقد سجل هذان النوعان تجارياً فى فرنسا وبريطانيا . وبحلول ١٩٨١ كان هناك أكثر من عشرين ألف شجرة مثمرة قد عوملت تجارياً بالفطريات المذكورة .

لم يقتصر استعمال الجنس *Trichoderma* على الجروح فقط ، وإنما استعمله Tron-somo و Dennis سنة ١٩٧٧ لحفظ ثمار الفراولة من مرض عفن المخزن المتسبب عن الفطر *Botrytis cinerea* ، *Mucor mucedo* عن طريق رش نباتات الفراولة فى الحقل ابتداء من أول التزهير بمعلق مائى من الجراثيم الكونيدية لكل من *T. viride* و *T. polysporum* ، وكانت نتيجة المقاومة الحيوية تشبه نتيجة استعمال المبيد الفطرى *Dichlofluanid* . كذلك أمكن حفظ ثمار الخوخ ضد مرض البقعة العينية المتسبب عن الفطر *B. cinerea* وذلك برش الجراثيم الكونيدية للفطر *T. pseudokoningii* بعد الحقن الصناعى للأزهار بالكائن الممرض وليس عند حدوث المرض من الحقن الطبيعى . إن إنخفاض نجاح المقاومة الحيوية لهذا المرض عند حدوث الإصابة الطبيعية ، يكون بسبب درجة الحرارة

المنخفضة السائدة وقت الإزهار . وجد أن الفطر المضاد *T. pseudokoningii* غير قادر على النمو على حرارة أقل من 9° م ، بينما الفطر الممرض *B. cinerea* ، يمكن أن يعيش ويهاجم النبات على حرارة أقل من 9° م . أما بالنسبة للفطر *T. harzianum* ، وجد أن رش جراثيمه الكونيدية على أزهار التفاح يخفف الإصابة بمرض البقعة العينية على الثمار ، وذلك لأن هذا الفطر يستطيع أن ينمو تحت درجات حرارة منخفضة ، كذلك وجد أن مقدرة الفطر *T. harzianum* ضد الفطر *B. cinerea* على العنب في الحقل تعتمد على درجة الحرارة وعلى تركيز اللقاح المستعمل من الجراثيم الكونيدية .

### المضادات الحيوية التي يكونها الجنس *Trichoderma*

يبين شكل رقم 9 المضادات الحيوية التي يكونها الفطر *Trichoderma spp.*

رقم ١ : *Trichodermol* ويفرزها الفطر *T. polysporum* .

رقم ٢ : *Harzianum* ويفرزها الفطر *T. harzianum* .

رقم ٣ : *Harziandione* ويفرزها الفطر *T. harzianum* . بعض سلالات معينة .

رقم ٤ : *6 - pentyl - 2 - pyrone* ويفرزها الفطر *T. harzianum* السلالة المعروفة باسم (IMI 275950) . وجد أن هذا المركب فعال بتركيز ١٠ أجزاء في المليون ضد الفطر

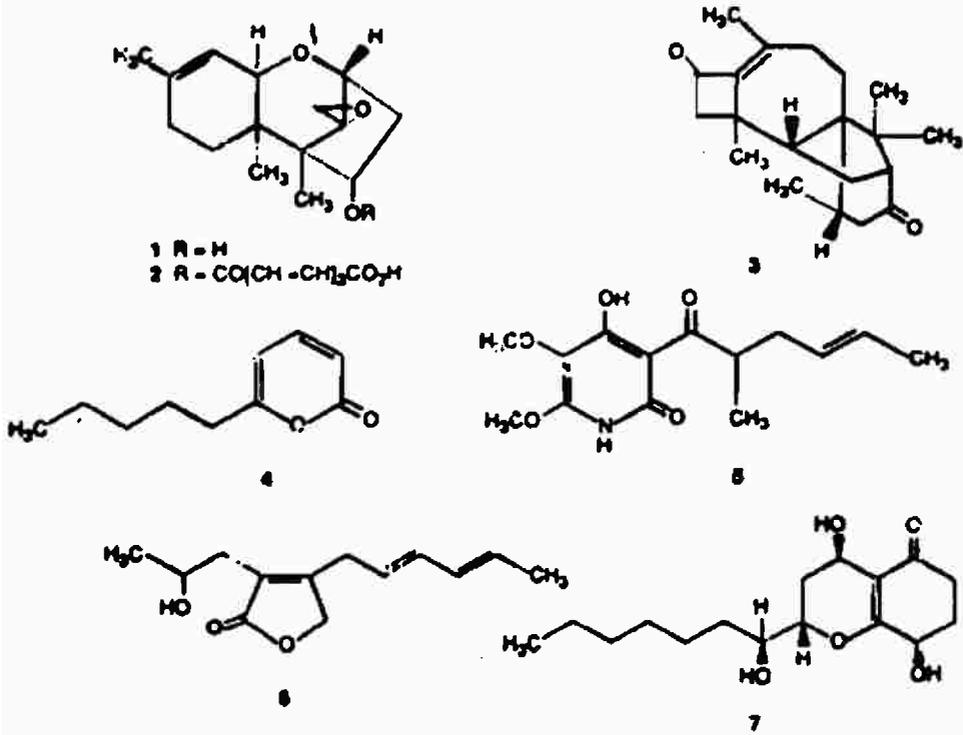
*R. solani* والفطر مسبب المرض الماحق في القمح . وهو يعطى مقاومة جيدة دون التأثير على النبات وينطلق ويتخلل التربة ، ويمكن أن يعمل كمدخن متوسط الفاعلية .

رقم ٥ : *Pyridone harzianopyridone* وتفرزه السلالة (IMI 298371) من الفطر *T.*

*harzianum* وهو يؤثر على الفطر *Botrytis cinerea* ويؤثر على *R. solani* بتركيز ١ ملغ/١ مل .

رقم ٦ : *harzianolide* ، *Butenolide* ويفرزها *T. harzianum* تحت ظروف معينة .

رقم ٧ : *Polyketides* ويفرزها الفطر *T. harzianum* تحت ظروف معينة .



شكل (٩) : التركيب الكيماوى للمضادات الحيوية التى يفرزها الفطر *Trichoderma spp.*

- Trichodermol - ١
- Harzianum - ٢
- Harziandione - ٣
- 6-pentyl - 2- pyrone - ٤
- Pyridone harzianopyridone - ٥
- Butenolide , harzianolide - ٦
- Polyketides - ٧

## تريكوديرما عامل مقاومة حيوية ضد الفطريات الممرضة النباتية

### Trichoderma As A Biocontrol Agent Against Pathogenic Fungi

#### مقدمة :

هناك بعض الكائنات الحية الدقيقة ، لها فوائد عملية فى خفض شدة الأمراض النباتية وتشجع نمو وتكاثر المحاصيل النباتية ، عندما تستعمل كمعاملة بذور أو معاملة تربة أو الأجزاء النباتية الأخرى . عوامل المقاومة الحيوية ، هذه ، موجودة بشكل عام فى منطقة الرايزوسفير فى النباتات . كذلك فإن البكتيريا والكائنات الدقيقة الأخرى (سلالات كثيرة من الفطريات) وصفت بأنها عوامل مقاومة حيوية ضد الفطريات الممرضة للنبات . لقد ذكر فى أوائل الستينيات أن الفطر *Phebia gigantea* يستعمل لمقاومة *Heterobasidium annosus* ، وبهذا يصبح أول عامل مقاومة حيوية يتم استعماله عملياً . ثم بعد ذلك استعملت سلالات غير ممرضة من الفطر *Fusarium* لمقاومة ذبول البطاطا الحلوة المتسبب عن الفطر *Fusari-um sp.* كذلك فإن سلالات من الفطر *Verticillium biguttatum* استعملت لمقاومة إصابة محصول البطاطا الحلوة ، بالفطر *R. solani* . ثم بعد ذلك فطريات أخرى مثل *Co-Pythium nunn* أو *Sporidesmium sclerotivorum* ، *niothyrium minitans* قد استعملت فى المقاومة الحيوية وبعضها يسوق تجارياً .

هذه الأجناس درست بشكل استثنائي ، إلا أن مجمل الدراسة (حوالى ١٩٠) فى مجال المقاومة الحيوية لأمراض النبات الفطرية ، أجريت على سلالات الجنس *Trichoderma* . من هذه الأنواع :

- 1 - *T. harzianum*    2 - *T. viride*    3 - *T. virens*  
4 - *T. hamatum*    5 - *T. koningii*    6 - *T. pseudokoningii*

يرجع الاهتمام بالفطر تريكوديرما فى مقاومة أمراض النبات إلى عدة أسباب . السبب الأول : كثرة أعداد الأبحاث المنشورة عنه والتي تظهر كل سنة ، والتي تكون فيها سلالات التريكوديرما عوامل مقاومة حيوية جيدة . السبب الثانى : ارتفاع أعداد سلالات التريكوديرما المسوقة تجارياً فى الوقت الحالى . أما السبب الثالث فهو الكميات الكبيرة من هذه المنتجات المستعملة بواسطة المزارعين كل سنة .

تأكيداً للأبحاث التي ذكرت بأن التريكوديرما يقوم بدور هام كعامل مقاومة حيوية ، هناك في منطقة Valley of Rhone ينتج حوالي ١٥ طن سنوياً من لقاح التريكوديرما ضد الفطر *Armillaria* ، حيث أن هذا الفطر المضاد يستعمل كثيراً في أماكن كثيرة من المناطق الزراعية هناك .

إن نجاح سلالات التريكوديرما كعوامل مقاومة حيوية مبنى على عدة عوامل :

- ١ - كفاءة هذه السلالات العالية في التكاثر .
  - ٢ - مقدرتها على البقاء وتحمل الظروف غير الملائمة .
  - ٣ - فعاليتها في مكافحة الفطريات الممرضة النباتية .
  - ٤ - فعاليتها في تشجيع نمو النبات .
- هذه الصفات ، جعلت الفطر تريكوديرما جنس موجود دائماً وبكثرة في أى مكان ، وبكثافة عالية بنسبة ٣ ٪ من مجموع العزلات الفطرية في الغابات ، وحوالى ١,٥ ٪ من العزلات المأخوذة من التربة العادية . زيادة على ذلك ، فإن لقاح التريكوديرما يتكشف وينمو أفضل في الرايزوسفير حول النباتات المريضة منه حول النباتات السليمة ، وذلك لأن النباتات المريضة تفرز مواد تستعمل من قبل الفطر تريكوديرما كمغذيات مناسبة لنموه .

### سلالات التريكوديرما كعوامل مقاومة حيوية :

لقد ذكرت صفة التضاد الفطرى الطبيعية ، بأنها متوفرة في الجنس تريكوديرما منذ أكثر من ستين عاماً ، إلا أن أول تقرير عن تجارب المقاومة الحيوية التي يستعمل فيها الجنس المذكور ، تحت ظروف الحقل الطبيعية منذ ٤٠ سنة (هذا ما ذكره *Chet et al* سنة ١٩٩٧) . بعد ذلك حدث تقدم كبير في اتجاه تحسين الجنس كعامل مقاومة حيوية في العشرة سنوات الماضية ، أكثر مما حدث له خلال الستين سنة السابقة . نظراً لأن هناك عدة عزلات من هذا الجنس ، قد أمكن الحصول عليها من أماكن تواجدها الطبيعية ، وتستعمل في تجارب المقاومة الحيوية ، ضد عديد من الكائنات الممرضة الكامنة في التربة (جدول رقم ٧٧) ، وأن تسجيل هذا الجنس بواسطة وكالة وقاية البيئة أكد أنه عامل مقاومة حيوية يستعمل تجارياً ، كان تويجاً لعديد من الأبحاث التي أجريت على هذا الجنس .

جدول رقم ٧٧ : أنواع من التريكوديرما المستعملة في مقاومة بعض الأمراض الفطرية الكامنة في التربة .

| Antagonist              | Target pathogen                                                                                                                                                                                                | Host                                                                                                   |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>T. harzianum</i>     | <i>Sclerotium rolfsii</i><br><i>Pythium ultimum</i><br><i>Fusarium oxysporum</i><br><i>Rhizoctonia solani</i><br><i>Verticillium spp.</i><br><i>Botrytis cinerea</i><br><i>B. cinerea</i><br><i>B. cinerea</i> | Sugar beet<br>Lettuce<br>Narcissus, cotton<br>Lettuce, bean<br>Tomato<br>Tomato<br>Strawberry<br>Grape |
| <i>T. hamatum</i>       | Take-all<br><i>F. oxysporum</i><br><i>R. solani</i><br><i>R. solani</i>                                                                                                                                        | Wheat and rye-grass<br>Narcissus<br>Tomato<br>Cotton, snap beans                                       |
| <i>T. viride</i>        | <i>Penicillium digitatum</i><br><i>Phytium ultimum</i><br><i>F. oxysporum</i><br><i>R. solani</i>                                                                                                              | Orange<br>Lettuce<br>Narcissus<br>Cotton, Tomato, Potato, snap beans                                   |
| <i>T. virens</i>        | <i>P. ultimum</i><br><i>R. solani</i><br><i>Phytophthora spp.</i>                                                                                                                                              | Cotton<br>Potato<br>Apple tree                                                                         |
| <i>T. koningii</i>      | Take-all<br><i>R. solani</i>                                                                                                                                                                                   | Wheat and rye-grass<br>Cowpea                                                                          |
| <i>T. polysporum</i>    | <i>Fomes annosus</i>                                                                                                                                                                                           |                                                                                                        |
| <i>T. reesei</i>        | <i>Rhizopus stolonifer</i>                                                                                                                                                                                     |                                                                                                        |
| <i>Trichoderma spp.</i> | <i>Rhizoctonia</i><br><i>Phytium</i><br><i>Rhizoctonia</i><br><i>Verticillium</i><br><i>Pythium</i><br><i>Rhizoctonia</i><br><i>Sclerotium</i>                                                                 | Vegetables,<br>Field crops<br>Potato<br>Mushrooms<br>Pea<br>Radish<br>Apple seedling                   |
| <i>G. roseum</i>        | <i>Verticillium dahliae</i>                                                                                                                                                                                    | Potato                                                                                                 |
| <i>Gliocladium spp.</i> | <i>Rhizoctonia</i><br><i>Pythium</i>                                                                                                                                                                           | Ornamentals                                                                                            |
| <i>Gliocladium spp.</i> | <i>Sclerotium</i>                                                                                                                                                                                              | Bean                                                                                                   |
| <i>Gliocladium spp.</i> | <i>Rhizoctonia</i>                                                                                                                                                                                             | Peanut                                                                                                 |

تتميز سلالات هذا الجنس ، بأنها متحملة لأنواع من المبيدات الفطرية (جدول رقم ٧٨) . أيضاً تتميز هذه السلالات بأنها تعتمد فى فعلها على التضاد الفطرى ، وهذا التضاد يعتمد على ميكائزمز مختلفة ، والتي يمكن أن تعمل تعاونياً ، وتكون مهمة فى عمليات التضاد التى تعتمد على عديد من العوامل ، تشمل هويات سلالات الجنس تريكوديرما وعلى طبيعة الفطر الممرض الذى يحصل ضده تضاد ، بالإضافة إلى الظروف البيئية شاملة المغذيات pH ، الحرارة ، تركيز الحديد المتوفر وغيرها .

جدول رقم ٧٨ : يبين أنواع الفطر تريكوديرما والمبيدات الفطرية التى تتحملها .

| STRAIN                   | FUNGICIDE                                                  |
|--------------------------|------------------------------------------------------------|
| <i>T. viride</i> T1      | Benomyl                                                    |
| <i>T. harzianum</i>      | Benomyl                                                    |
| <i>T. harzianum</i> WT-6 | Benomyl                                                    |
| <i>T. viride</i>         | Benomyl                                                    |
| <i>T. virens</i>         | Benomyl                                                    |
| <i>T. harzianum</i>      | Benomyl                                                    |
| <i>T. viride</i>         | Benomyl                                                    |
| <i>G. virens</i>         | Benomyl                                                    |
| <i>Trichoderma spp.</i>  | Methyl<br>bromide                                          |
| <i>Trichoderma spp.</i>  | PCNB                                                       |
| <i>T. viride</i>         | Captafol                                                   |
| <i>T. harzianum</i>      | Captan                                                     |
| <i>Trichoderma spp.</i>  | Chlorothaloni<br>I Iprodione<br>Procymidone<br>Vinclozolin |
| <i>T. harzianum</i>      | Diclofluanide                                              |

## الميكائزم الداخل فى المقاومة الحيوية من قبل أنواع التريكوثيرما :

### ١ - تشجيع العوامل الدفاعية فى النبات

#### Stimulation of The Plant Defensive Mechanisms

تنتج بعض سلالات التريكوثيرما عوامل نمو مثل الأكسينات ، سايتوكينينز ، Citoquinines ، والإيثلين ، هذه تشجع نمو النبات وتشجع الميكائزم الدفاعى فيه ، وكذلك تشجع تكوين الميكوريزا . تسبب هذه العوامل زيادة فى نمو النبات تصل إلى ٣٠٠٪ فى بعض الحالات . فى بعض التجارب التى أجريت فى البيوت الزجاجية ، كانت الزيادة فى الانتاجية ملموسة بالمقارنة مع الكنترول ، وذلك عندما عوملت بذور النبات مسبقاً بجراثيم الفطر تريكوثيرما . حتى فى الأراضى غير الملوثة بالمرضات ، تحدث زيادة الانتاجية بعد إضافة جراثيم التريكوثيرما إلى التربة ، هذا يكون بسبب انتاج عوامل مشجعة لنمو النبات من قبل هذا الفطر .

### ٢ - المنافسة Competition

تعتبر المجاعة من أكثر الأسباب شيوعاً ، فى موت الكائنات الحية الدقيقة ضعيفة المنافسة . وبالتالي فإن المنافسة على قدر محدود من العوامل الغذائية (الحديد مثلاً) ، يمكن أن يكون لها دوراً كبيراً فى المقاومة الحيوية للكائنات الممرضة النباتية . تنتج بعض سلالات الجنس تريكوثيرما سايدروفورز فعالة فى / والتى تجذب إليها الحديد ، وبالتالي توقف نمو الفطريات الأخرى . وبالتالي فإن السلالات مثل T35 من النوع *T. harzianum* والتى تقاوم الفطر *F. oxysporum* يكون ذلك عن طريق المنافسة على المغذيات واستعمار الرايزوسفير . يعتبر الفطر قوياً فى التضاد الفطرى إذا توفرت فيه الصفات الآتية :

- ١ - عندما يكون لديه قدرة على التغلب على التأثيرات الفطرية السامة فى التربة ، الناتجة من نواتج التمثيل الغذائى من أنواع الفطريات الأخرى .
- ٢ - عندما يكيف نفسه تحت ظروف شديدة المنافسة .

تنمو سلالات التريكوثيرما بسرعة عندما تحقن فى التربة وذلك لسببين :

- ١ - هذه السلالات مقاومة بطبيعتها لكثير من المواد السامة مثل مبيدات الحشائش والمبيدات الفطرية .

٢ - تستطيع هذه السلالات أن تعيد نفسها بسرعة كبيرة ، بعد إضافة جرعات مؤثرة كبيرة (قبل الموت) من هذه المواد السامة .

### ٣ - التضاد الحيوى Antibiosis

يدل مفهوم هذا الاصطلاح ، على التفاعلات التي تشمل مركبات قابلة للانتشار ذات وزن جزيئى منخفض ، أو المضادات الحيوية المنتجة بواسطة الكائن الحى الدقيق ، والتي تثبط نمو كائن حى دقيق آخر . بالنسبة للجنس تريكوديرما ، فإن لديه سلالات مختلفة تنتج مركبات متطايرة وغير متطايرة والتي تثبط نمو الفطريات الممرضة . بعض سلالات تريكوديرما والتي معظمها ينتمى إلى النوع *T. reesei* تنتج مضادات حيوية ذاتية ، مثل *Trichodermin* ، والذي هو يثبط تماماً نمو كثير من الكائنات الممرضة الفطرية التي أجريت عليها التجارب . هناك سلالات أخرى من التريكوديرما تنتج *Peptides* مثل *Alamethicin* ، *Gliotoxin* ، *Gliovirin* و *Trichorzianine* ومضادات حيوية أخرى مثل *Viridin* و *Pyrones* ، كل هذه المركبات لها تأثير نشيط وفعال ضد الفطريات عندما تكون موجودة مع الفطريات الممرضة النباتية .

هناك أدلة أخرى ، قد دعمت الدور المهم للمضادات الحيوية ، المنتجة والداخلية فى المقاومة الحيوية للكائنات الممرضة النباتية . كثير من عوامل المقاومة الحيوية ، تنتج مضادات حيوية فى المعمل ، فى بعض الحالات فإن إنتاج المضاد الحيوى ، يرتبط مع كفاءة المقاومة الحيوية ، حيث وجد أن تأثير المضادات الحيوية النقية يشبه تأثير عامل المقاومة الحيوية الذى انتجه فى المقاومة الحيوية . تكون الطفرات التى تفتقر إلى إنتاج المضادات الحيوية أقل فاعلية فى المقاومة الحيوية من الأبويين . بعض المضادات الحيوية المنتجة بواسطة عوامل المقاومة الحيوية يمكن أن تعزل من أماكن التواجد الطبيعى لهذه العوامل مثل الرايزوسفير . لقد كان يعتقد لمدة طويلة أن تأثير المضادات الحيوية فى المقاومة الحيوية التى يبديها الجنس تريكوديرما غير مؤكدة .

ثبت بأن كثير من سلالات تريكوديرما ، تنتج كميات كبيرة من المضادات الحيوية مثل *Gliovirin* ، الذى تنتجه طفرات من *T. virens* ، والتى تسبب مقاومة حيوية شبيهة للنوع الأصيل ، وبالإضافة لذلك فإن سلالات من الفطر *T. longibrachiatum* ، والتى هى مضادة للفطر *Mycena citricolor* الذى يسبب مرض نبقع الأوراق فى القهوة ، تنتج كل من *Bisvertinol* ، *Sorbicillin* ، *Bisvertinolone* و *Trichodimenol* ، والتى ليس لها تأثير

حيوى ضد *M. citricolor*. ومن ناحية أخرى فإن السلالات التي تفتقر إلى المضاد الحيوى مثل الطفريات التي تفتقر إلى Gliovirin من الفطر *T. virens* ، تفشل في وقاية بادرات القطن من الإصابة بالفطر *P. ultimum* ، في حين أن السلالة الأصلية تقوم بالوقاية .

لقد أثبت العالم Howell سنة ١٩٩٦ في دراسته على المقاومة الحيوية ، باستعمال *T. virens* لسقوط بادرات القطن المنتسب عن الفطر *P. ultimum* ، أن بعض السلالات تنتج Gliovirin ، viridiol ، Viridin ، وتبين أن جميع السلالات التي تنتج لأن تكون عوامل مقاومة حيوية تنتج Gliovirin . كذلك فإن عزلات الفطر *T. harzianum* المأخوذة من جذور القمح ، تنتج كل من المواد الآتية : Cyclonerodiol و Octaketide ketodiol ، كلاهما يظهر نشاط فعال في المقاومة الحيوية لفطر المرض الماحق في القمح *Gaeumannomyces graminis var. tritici* ، بينما بعض العزلات من الفطر *T. virens* تنتج viridin ، viridiol ، Gliovirin ، Gliotoxin ، إلا أن بعض السلالات لا تنتج هذا المركب الأخير .

إن نمو وتجذرم كلاً من الفطريات الممرضة *P. ultimum* ، *R. solani* ، *Sclerotium rolfsii* يشبط بقوة بواسطة Gliotoxin فقط . أيضاً فإن الـ viridin يكون أكثر فعالية في تثبيط نمو الفطر *R. solani* منه في كل من *P. ultimum* و *S. rolfsii* .

إن أكثر السلالات (التابعة للفطر *T. harzianum*) فعالية في مقاومة الفطر الماحق في القمح هي التي تنتج نوعين من المضادات الحيوية التي تتبع Pyrone . كذلك فإن الفطر *T. koningii* أيضاً تنتج مشتقات الـ Pyrone والذي يشبط نمو فطر المرض الماحق في النجيليات وفطريات ممرضة أخرى نباتية . كذلك فإن مقدرة سلالات *T. hamatum* و *T. harzianum* على إفراز مركبات Pyrones كمضادات فطرية ، تعتبر هي الأساس في استعمال هذه السلالات في المقاومة الحيوية تجارياً . وكذلك وجد أن السلالات من *T. polysporum* المستعملة في مقاومة *Fomes annosus* تنتج مشتقات O- و O-acetyl Anthraguinones التي تشبط بشكل ملحوظ كثيراً من الكائنات الممرضة .

من الأمور الهامة التي درست في مجال المضادات الحيوية ، هي ظهور سلالات من الكائنات الممرضة الفطرية مقاومة لهذه المضادات الحيوية . نظراً لأن المضادات الحيوية متخصصة واختيارية ، فمن الممكن ظهور سلالات مقاومة لها ، إلا أنه يمكن القول بأن

سلالات الفطر تريكوديرما لديها أكثر من ميكانزم في إنتاج المضادات الحيوية ، وهذا يؤدي إلى تنوع المضادات الحيوية المنتجة ، وبالتالي من الصعوبة بمكان ، أن يظهر سلالات من الكائنات الممرضة مقاومة لجميع هذه المضادات المنتجة ، بالإضافة إلى أن سلالات التريكوديرما لا تعتمد كلية في عملها على المضادات الحيوية ، بل هناك ميكانزم أخرى نستعملها في مقاومة الكائنات الممرضة النباتية .

#### ٤ - التطفل الفطري Mycoparasitism

يعرف التطفل الفطري بشكل عام ، بأنه المهاجمة المباشرة من قبل الفطر (عامل المقاومة الحيوية) على التركيبات الفطرية (للفطر الممرض) سواء كانت ميسيليوم أو جراثيم أو سيكليروسيم (أجسام حجرية) يتبع ذلك ، استعمالها كمغذيات للفطر المتطفل . عندما يتطفل فطر على فطريات ممرضة متطفلة أخرى عندئذ يستعمل الاصطلاح فوق التطفل Hyper parasitism .

يقسم التطفل الفطري إلى قسمين من حيث التغذية :

١ - تغذية على مواد ميتة Necrotrophic parasitism .

٢ - تغذية حيوية Biotrophic parasitism .

بالنسبة للطفيليات التي تتطفل على مواد ميتة ، فإن هذا الطفيل يقتل خلايا العائل قبل أو مباشرة بعد إختراقها لاستعمال المواد الغذائية المنطلقة . أما المتطفل ذو التغذية الحيوية فإنه قادر على الحصول على المواد الغذائية ، من خلال العائل الحي بدون احداث أضرار ، أو بسبب أضراراً بسيطة للعائل في المراحل المبكرة من التطفل الفطري . بالنسبة للتطفل على المواد الميتة فإنه يكون أكثر عدوانية وله مجال واسع من العوائل ، ويكون غير متخصص في طريقة تطفله . أما تطفل التغذية الحيوية ، فإن مجاله يكون مقيد أكثر من حيث العوائل ، ويكون تركيبات متخصصة لامتناس المواد الغذائية من عوائله . يكون التطفل ذو التغذية الحيوية أكثر انتشاراً في الطبيعة من التطفل ذو التغذية على المواد الميتة .

السلالات المتطفلة فطرياً من الفطر *Trichoderma* تكون من النوع ذو التغذية على مواد ميتة ، تشمل هذه العملية عدة خطوات ، التعرف على العائل ، الألتفاف ، تكوين عضو التصاق ، الإختراق وهضم تركيبات العائل . هناك أنواع عديدة من علاقات التطفل الفطري بين الفطر تريكوديرما وعوائله ، منها الألتفاف حول العائل ، الإختراق ، وهذا يعتمد

على الظروف الخارجية ، وعلى عمر الميسيليوم ، حيث تكون الهيفات القديمة أقل مقدرة على اختراق هيفات العائل .

يمكن أن يكون لانتاج الأنزيمات دور كميكانزم للمهاجمة من قبل سلالات تريكوديرما ، وبالتالي يكون لها دوراً فى المقاومة الحيوية ، وفى بعض الأحيان لا يكون لها أى دور . وهذا يعتمد على السلالات المتخصصة من الفطر تريكوديرما وعلى نوع العائل وسلالاته ، تركيب جدار خلية العائل والظروف المحيطة الخارجية . من الدراسات العديدة التى أجريت على سلالات التريكوديرما ، وجد أن بعضاً منها يقوم بدوره فى قتل عائله باستعمال الإنزيمات ، وسلالات أخرى لا تستعمل الإنزيمات .

لقد تأكد دخول الأنزيمات المحللة للخلية فى عملية التضاد الفطرى ، اعتماداً على التجارب المعملية التى ثبت فيها مقدرة السلالات الفطرية من الفطر تريكوديرما على انتاج الأنزيمات المحللة للخلية مثل Lipases ، Proteases ، Glucanases ، Chitinases ، Phosphatases ، فى المزارع المزروجة للفطر تريكوديرما والفطريات الأخرى الممرضة بالمقارنة مع نتائج المزارع المفردة التى يستعمل فيها فطر واحد . لقد وجد أن هيفات الفطر *T. harzianum* تهاجم هيفات الفطر الممرض حيث تحلل أماكن الاختراق وتدخل فى تجويقات الهيفا وتسبب تحللها . هذا يؤدى إلى القول بأن تحطيم الخلايا يكون ناجماً عن تحلل أنزيمى باستعمال Chitinases و Glucanases المنتجة بواسطة التريكوديرما .

ذكر بعض الباحثين أن تحطيم الهيفا الفطرية ، يعود إلى المعاناة الغذائية المتسببة عن التطفل الفطرى والذى لا يفرز Hydrolases والذى تؤدى فى النهاية إلى التحلل الذاتى لجدار خلية العائل . زيادة على ذلك فإنه تحت ظروف طبيعية معينة ، فإن أنزيمات الهيدرولايتيك يبدو أنها تكون غير نشيطة وإن جدر الهيفا الحية تهرب من التحلل . تتحطم الجدر الهيفية فقط عندما يصبح سيتوبلازم العائل فى مرحلة الاحتضار نتيجة فعل السموم ، انطلاق أنزيمات الهيدرولايتيك ، بواسطة الفطر تريكوديرما .

ذكر بعض المؤلفين ، أن معظم سلالات التريكوديرما ، تسبب التحطيم الفطرى للفطريات الممرضة ، عن طريق التضاد الحيوى الذى يؤدى إلى موت الخلية ، ويتبع ذلك تحطيم جدر الخلية بواسطة أنزيمات الهيدرولايتك ، كما ذكر البعض الآخر من الباحثين أن هناك تعاوناً بين أنزيمات الهيدرولايتك والمضادات الحيوية ، وأن لكل منهما دوراً فى التضاد الحيوى .

## تحسين سلالات التريكوديرما كعوامل مقاومة حيوية

Improvement of Trichoderma  
Strains As Biocontrol Agents

## مقدمة :

إن المعرفة غير المؤكدة عن القواعد الوراثية في الفطر تريكوديرما ، جعلت تطبيقه محدود نسبياً كعامل مقاومة حيوية في السنوات الماضية . إذا ما أريد تحسين سلالات هذا الفطر وراثياً ، يجب استعمال التحول الوراثي ، التكامل الوراثي وإعادة التركيب الوراثي . ولغاية الآن فإن السلالات المحسنة التي تم الحصول عليها ، كان باستعمال المطفرات ، مثل الأشعة فوق البنفسجية ، ولكن هذه الطفرات كانت محدودة بالنسبة للسلالات المقاومة للـ Benomil والسلالات المنتجة كميات كبيرة من Gliovirine .

لقد أجريت تجارب على اندماج البروتوبلاست بين سلالات التريكوديرما - or - Intra Intergenic باستعمال طفرات مقاومة لكل من Benomyl ، Hygromycin أو Propi-conazole واختبار الهجن في بيئة مناسبة . استطاع Toyama et al سنة ١٩٨٦ باستعمال طريقة Recombinants أن يحصل من *T. reesei* على سلالات لها قوة مضاعفة من نشاط أنزيم سيلوليز عن الأبوين . وبالتالي يمكن الحصول على سلالات ذات قوة تحليل خلوية عالية بالمقارنة مع النوع الأصلي باستعمال هذه الطريقة المذكورة . كذلك فإن الإندماج البروتوبلاستي يستعمل في اتحاد الصفات الوراثية المرغوبة للمقاومة الحيوية من السلالات المختلفة من الفطر *T. harzianum* .

بالإضافة لذلك فإن الـ Heterokaryons قد حصل عليها بواسطة الاتحاد الهيفي Anastomosis في الفطر *T. pseudokoningii* ، تكون الهجن غير ثابتة وتمر في دورات تشبه Parasexual . تنتهي العملية باتحادات والتي تختلف في الشكل المورفولوجي ومن الممكن أيضاً في تركيب الجينوم الخاص بها . كذلك أمكن الحصول على hyperpoly-ploids المفترض والـ Aneuploids من الفطر *T. reesei* بالمعاملة بالكولشيسين ، وقد أظهرت نشاط عال من السيلوليز .

## ١ - تحسين كفاءة الهيدرولايك *Improvement of The Hydrolytic Capacity*

نتيجة لدراسة أنزيمات الهيدرولز بين الخلوية للجنس تريكوديرما ، وما يتعلق بها من جينات ، يمثل نقطتين هامتين :

١ - إمكانية عزل سلالات ذات مستويات عالية فى انتاج الأنزيم ، من سلالات التريكوديرما والتي هى معروفة مسبقاً بأنها عوامل مقاومة حيوية جيدة .

٢ - تحسين ميكانيكيات الدفاع فى النبات ، ضد الفطريات الممرضة النباتية ، عن طريق التعبير عن هذه الأنزيمات (الهيدرولسز) فى النباتات .

بالنسبة للنقطة الأولى ، أمكن الحصول على سلالات من التريكوديرما عند زراعتها على البيئة مع وجود ميسيليوم ، وجدر خلوية من الفطريات ، فايثوفثورا ، فيوزاريوم ، بوترايتس وفطريات ممرضة أخرى أظهرت هذه السلالات إمكانية انتاج Glucanases والـ Chitinases وأيضاً زيادة فى نشاط التضاد الفطرى لبعض هذه الأنزيمات .

إن كثيراً من أنزيمات الهيدرولسز للفطر *T. harzianum* قد تم تعريفها وتنقيتها ، وأن بعض الجينات المشفرة لها قد أمكن كلونتها فيما بعد . إن معظم جينات الفطر تريكوديرما موجودة بشكل نسخ مفردة وتنسخ بانتظام وإن إجراء عملية الـ Amplificating لها يمكن أن يزيد فى كفاءة التضاد الفطرى أكثر من الأنواع الأصلية .

## ٢ - تحسين انتاج المضادات الحيوية *Improvement of Antibiotic Production*

لم يكن واضحاً لغاية أوائل الثمانينيات بأن مطفرات التريكوديرما قد استعملت للحصول على سلالات ذات فعالية عالية فى المقاومة الحيوية ، أو لها مقدرة عالية على تحمل المبيدات الفطرية . ولقد أمكن الحصول على طفرات من *T. virens* تختلف عن سلالات النوع الأصلية فى مقدرتها على انتاج المضاد الحيوى Gliovirin . أما الطفرات المخلقة باستعمال الأشعة فوق البنفسجية من الفطر *T. virens* فهي ذات مقدرة عالية فى انتاج الـ Gliovi-rin وذات قدرة عالية فى وقاية نباتات القطن من مرض سقوط البادرات الناتج عن الفطر *P. ultimum* عنه فى السلالات الأصلية . ولقد تبين أن الطفرات التى تنتج كميات أعلى من نواتج التمثيل فى بيئة Gliotoxin ، تكون أكثر فعالية فى التضاد الفطرى ضد فطر العفن الأبيض فى البصل .

ولقد تبين أن السلالات ذات الانتاج العالى من المضاد الحيوى ، تكون أيضاً ذات سرعة نمو عالية وتتصف أيضاً بمعدل نمو عال نسبياً ، وأن هذه الطفرات هي ذات القدرة الأفضل فى التضاد الفطرى .

### ٣ - تحسين مقاومة سلالات التريكوثيرما للمبيدات الفطرية

#### Improvement for fungicide Resistance

يمكن أن يكون استعمال عامل المقاومة الحيوية بمفرده ، أحياناً ، غير كاف ، مما يلجأ إلى استعمال التحوادات من عوامل المقاومة الأخرى مثل ، استعمال المدخنات فى التربة ، أو استعمال المبيدات الفطرية بنصف الجرعة المحددة لها ، هذا يمكن أن يؤدي إلى نتائج ممتازة وفعالة فى المقاومة . إن التحوادات عوامل المقاومة الحيوية والمبيدات الفطرية ، أو حتى الأنزيمات النقية مع المبيدات الفطرية أدى إلى جعل المقاومة الحيوية ذات تأثير واسع ، ويغضى على بعض سلبيات استعمال عوامل المقاومة الحيوية بمفرده .

لقد وجد أن التحواد الفطر *T. harzianum* مع مركبات بنتاكلورونترينزين ، يزيد مقاومة المرض أكثر من استعمال كل منها لوحده . كذلك عند استعمال التريكوثيرما مع المبيد الفطرى Chlorothalonil رشاً على الأوراق المصابة بالفطر المرض *Botrytis squamosa* وذلك بمعدل ٣-٤ رشات على فترات أسبوعية ، أدى إلى خفض المرض بنسبة ٦٠ ٪ من كثافة تبقع الأوراق . وحتى تتم هذه النتيجة يجب أن تكون سلالات الفطر تريكوثيرما مقاومة (أو متحملة) للمبيدات التى تستعمل معها .

حتى يتم الحصول على سلالات مقاومة أو متحملة للمبيدات الفطرية ، من الفطر تريكوثيرما ، استعملت طرق من الهندسة الوراثية لإدخال صفات المقاومة ضد المبيدات فى سلالات الفطر تريكوثيرما ، منها استعمال البلازميد المأخوذ من الفطر *Aspergillus niger* الذى يحمل جينات *amds* أو *hyg* ، حيث أن الجين الأول يزيد كفاءة استعمال الأستاميد كمصدر وحيد للنيتروجين ، أما الجين الثانى يعمل تغييرات لجعل السلالة قادرة على النمو فى وجود المضاد الحيوى هايجروميسين . الجينات المتجانسة من *Podospora* و *Neurospora* ، قد استعملت لتكملة طفرات *ura* فى الـ Auxotrophs للتريكوثيرما .

كذلك أمكن الحصول على سلالات من التريكوثيرما ذات قدرة عالية فى انتاج *Chitinases* ، والـ *Glucanases* و *Proteases* ، جميع هذه الأنزيمات ضرورية فى نجاح عامل المقاومة الحيوية ، حيث أنه يعتمد عليها فى التضاد الفطرى والتضاد الحيوى والتطفل .

## طرق استعمال التريكوديرما :

لقد مضت مدة طويلة بين اكتشاف التريكوديرما كعامل مقاومة حيوية في التجارب العملية وبين استثماره تجارياً . خلال هذه المدة تطورت طرق عديدة لاستعمال هذا الفطر تجارياً ، إبتدأت من حيث تنميته على نخالة القمح إلى تنميته على حبيبات طمى غنية بالمولاس . يمكن الآن تحضير هذا الفطر على عدة أشكال منها مسحوق ، كرات ، حبيبات أو على شكل مواد جيلاينية ، كذلك يمكن أن يستعمل على شكل كابسولات .

غالباً ما تحضير جراثيم الفطر تريكوديرما ، على شكل كتلة صلبة مخلوطة بمادة عضوية تسمى Alginate . تستعمل نخالة القمح كحامل لجراثيم الفطر . تبقى مثل هذه التحضيرات جافة لعدة أسابيع . يجب أن ترطب هذه الكتلة لمدة يومين قبل أن تستعمل في الحقل . هناك تحضير آخر للفطر يكون عبارة عن هيفات نامية على نخالة قمع معقمة ومرطبة بالماء ، هذه يمكن أن تستعمل كبديل للتحضيرات السابقة .

هناك ثلاثة أشكال يحضر عليها فطر التريكوديرما :

١ - قد يكون على شكل صلب ، محمولاً على أنواع مختلفة من النخالة أو على نخالة القمح أو على مخلوط من البيت Peat أو على حبيبات الشعير ، هذا التركيب يكون عبارة عن جراثيم فقط .

٢ - قد يكون على شكل سائل ، وهذا يستعمل للحصول على الجراثيم بكمية كبيرة جداً ، هذا الشكل غالباً ما يستعمل كمعاملة بذور .

٣ - يحضر على شكل مواد شبه صلبة توضع في صفائح مملوءة بالمولاس ، أو بعض أنواع الخميرة ، وهذا اللقاح يكون عبارة عن ميسيليوم وجراثيم كلاميديه .

لكي يكون المحضر الفطري متحملاً للجفاف ، يضاف إلى البيئة الغذائية النامي عليها الفطر *T. harzianum* نسبة ٩ ٪ غليسيرول ، وبالتالي فإن التحضيرات الناتجة من ذلك تتحمل الجفاف مدة طويلة . كذلك يفضل تنمية الفطر على بيئة شبكس ، وبيت وطحالب، حيث أنه في هذه الحالة ينتج كميات كبيرة من الجراثيم ذات عمر طويل . يمكن أن تضاف تحضيرات الفطر إلى التربة مباشرة وذلك لمقاومة الأمراض الكامنة في التربة، أو يمكن أن يستعمل رشاً على أجزاء النبات الهوائية ، أو يمكن أن يستعمل على شكل تغليف للبذور .

بالنسبة لطريقة أضافته إلى التربة ، يمكن أن يخلط مع سطح التربة ، أو يوضع في الخطوط التي ستزرع فيها البذور ، وهذه أفضل طريقة لاستعمال التحضيرات التجارية من الفطر *T. hamatum* أو الفطر *T. harzianum* . كذلك فإن هذه الطريقة يمكن أن تؤدي إلى تحطيم الكائن الممرض بسرعة أو منع تكوين أو إعادة بناء مستعمراته ، وتستعمل لوقاية البذور المنتجة .

عند استعمال المحضر التجارى Pyrax (مخلوط من Alginate مع الفطر *T. virens*) وأضافته فى خطوط الزراعة ، فإنه يمنع إصابة بادرات القطن بالفطر *R. solani* . عند استعمال Pyrax بنسبة ١٠<sup>٣</sup> كونيديا/كيلو غرام تربة ، فإنه يحفظ نباتات الفاصوليا من الإصابة بالفطر *S. rolfsii* . يمكن أن يستعمل المحضر التجارى مخلوطاً مع الأجزاء النباتية (مثل الدرنا ، العقل وغيرها) وذلك لوقاية النباتات من الإصابة بالفطر *R. solani* أو فيرتسليم . كذلك يمكن أن يستعمل رشاً على الأجزاء الخضرية فى النبات ، وذلك بعد عملية التقليم لحفظ النباتات من الإصابة عن طريق الجروح . هذا التحضير يكون بنسبة (٢-١) × ١٠<sup>٥</sup> جرثومة كونيديا/مل ماء ، يمكن أن يضاف إلى المعلق مادة لاصقة وذلك حسب سطح النبات .

### دور أنزيم Protease المفرز من قبل *T. harzianum*

#### فى مقاومة الفطر *Botrytis cinerea*

##### مقدمة :

إن إنتاج أنزيم بروتيناز شائعاً فى كثير من الكائنات الحية الدقيقة ، ومن ضمنها الفطريات وكذلك الفطر تريكوديرما . لقد ذكر بأن نشاط Proteolytic للفطر *T. viride* يدخل فى المقاومة الحيوية للفطر *S. rolfsii* فى التربة المعقمة بالأوتوغليف . أما فى البكتيريا *Bacillus megaterium* ، فإن أنزيم إندوبروتيناز يمكن أن يثبط الأنزيمات الخلوية الخارجية للفطر *R. solani* . لقد تمت تنقية واحداً من مجموعة أنزيمات الهيدرولايك والذى يعتقد بأنه يلعب دوراً مهماً فى التطفل الفطرى ، بواسطة الفطر *T. harzianum* وقد عرف على أساس أنه Serine protease . وجد أن الميسيليوم المعقم فى الأوتوغليف وتحضيرات جدار الخلية الفطرية أو الشيتين تستحث هذا الأنزيم ، وإن انتاجه يكبح بواسطة

الجلوكوز، وبالتالي فإنه لا يستحث بوجود الجلوكوز. كذلك وجد أن نشاط بروتيناز الفطر *T. harzianum* يزداد عندما تحتوي البيئة الغذائية السائلة مصدر نيتروجين عضوي . ولقد ذكر أن البروتيناز هذا ، يتدخل في تحطيم جدر خلية الكائن الممرض وكذلك الأغشية الخلوية وحتى البروتينات المنطلقة نتيجة تحلل الكائن الممرض وبالتالي توفر مواد غذائية للتطفل الفطري .

### دور الأنزيم في المقاومة الحيوية :

لقد درس دور الأنزيم Protease الذي يفرزه الفطر *T. harzianum* السلالة T39 في مقاومة الفطر الممرض *B. cinerea* . وجد أن هذه السلالة تفرز كمية تقدر بحوالى 58 mu/ml أما السلالة NCIM 1185 فوجد أنها تفرز كمية تقدر 54 mu/ml من هذا الأنزيم في اليوم الخامس من النمو على بيئة غذائية سائلة . أما على أوراق الفاصوليا المصابة بالفطر *B. cinerea* والمعاملة بالسلالتين المذكورتين فتبين أن كمية الأنزيم المفرز كانت ٠,٦ و ٠,٩ و ٠,٥ mu/ml للسلالتين بالترتيب. وكانت الكمية ٠,٥ mu/ml للفطر *B. cinerea* لوحده بعد ٤٨ ساعة من التحضين . أما في مزرعة السلالة T39 المذكورة سابقاً والمحتوية Protease ، كان هناك ٥٥ ٪ خفضاً في نسبة إنبات الفطر *B. cinerea* وخفض بنسبة ٨٠ ٪ في طول أنبوبة الإنبات بعد ١٧ ساعة من التحضير في العمل .

عندما استعملت عزلات الفطر تريكوديرما المذكورة سابقاً ، على أوراق الفاصوليا المصابة بالفطر الممرض *B. cinerea* ، فإنها تسببت في زيادة بناء البروتيناز فأصبحت 1 mu/ml للسلالة الأولى و 1.2 mu/ml للسلالة الثانية . كذلك فإن معدل إنبات جراثيم الفطر الممرض إنخفضت بنسبة ٩٨ ٪ بعد ٧ أيام من التحضين . كذلك فإن أنزيمات الهيدرولك المنتجة بواسطة الكائن الممرض ، وكذلك أنزيمات (PG) Endo-polygalacturonases و Exo-PG كلها قد ثبتت جزئياً بواسطة أنزيم Protease من عزلات الفطر تريكوديرما . أما المركب Carboxymethyl cellulase فإنه قد ثبت بواسطة بروتيناز السلالة الثانية من تريكوديرما .

أما على سطوح أوراق الفاصوليا ، فإن البروتيناز (الذى قد حصل عليه من البيئة الغذائية السائلة لعزلات الفطر تريكوديرما) أدى إلى خفض شدة الأصابة المرضية بنسبة ٥٦-١٠٠ ٪ . لقد جمعت البيئة الغذائية السائلة المحتوية بروتيناز المصنع على سطح أوراق الفاصوليا المعاملة بالفطر الممرض *B. cinerea* والفطر *T. harzianum* وأضيفت على أوراق طازجة مصابة

بالفطر الممرض، قد سببت خفضاً في شدة المرض يتراوح بين ٥٦ - ١٠٠٪ و ٣٠-٧٥٪ مع قطرات السائل المجموع من الأوراق المعاملة بالسلالة T39 و NCIM 1185 بالترتيب .

لقد تم الحصول على زيادة في خفض شدة المرض ، عن طريق اتحاد الجراثيم الكونيدية لعزلات الفطر *T. harzianum* مع البروتيز المتحصل عليه من البيئة الغذائية .

إن مثبطات البروتيز التي هي :

1 - trans - epoxysuccinyl - L - leucylamido - (guanidino) butane (E64).

2 - antipain hydrochloride

3 - Mixture of inhibitors

باستثناء Pepstatin A أبطلت كلياً أو جزئياً تأثير المقاومة الحيوية للسلالة T39 ، ووجد أن هذه السلالة فقيرة من حيث إنتاج Chitinase والـ  $\beta$ -1,3 glucanase في المعمل . هذه الأنزيمات لم يمكن اكتشافها على الأوراق المعاملة بالسلالة T39 ، وهذا أدى إلى الاقتراح بأن الـ Protease داخل في المقاومة الحيوية للفطر *B. cinerea* .

## المركبات المضادة الفطرية الذي يفرزها *R. solani*

### ضد الفطر *T. harzianum*

أجريت دراسة على العزلة Th008 للفطر *T. harzianum* لمعرفة مقدرتها على التضاد مع الفطر *R. solani* ، وجد أن عزلة الفطر تريكديرما تفرز مادة Trichodermin ذات وزن جزيئي ٢٩٢ ، وكذلك تفرز بيتايد صغير وزنه الجزيئي ٨٧٦ ، في البيئة الغذائية المزروعة فيها . وجد أن هذه المواد مضاده في المزرعة ، لنمو ميسيليوم الكائن الممرض الفطري الكامن في التربة *R. solani* السلالة 2B-12 ، والتي هي شديدة المرضية لبادرات فول الصويا .

عندما وضع ١٠٠ ملغ من الميسيليوم الجاف المعامل بالأوتوغليف مع الفطر *R. sola-ni* إلى ٢٠٠ مل من المزرعة الغذائية السائلة للفطر *T. harzianum* ، فإن كمية مركبات المضادات الفطرية المفرزة من قبل الفطر تريكديرما كانت ٣,٥ ضعف الكمية المفرزة فيما لو كان الفطر موجوداً لوحده .

يفرز الفطر *R. solani* مشتقات مادة Coumarin ذات وزن جزيئى ٣١٣ فى البيئة السائلة ، والتي تثبط نمو ميسيليوم الفطر *T. harzianum* . وعلى أية حال فإن تثبيط نمو ميسيليوم الفطر تريكوديرما ، يتطلب تركيز أعلى من تلك المركبات (المضادات الفطرية) التي يفرزها تريكوديرما ضد الكائن المرض . إن المكية المحتواه فى ١٠٠ ملغ من الميسيليوم الفطرى الجاف المعقم من الفطر تريكوديرما الموضوع فى ٢٠٠ مل بيئة غذائية سائلة للفطر *R. solani* لا يؤثر على كمية المركبات المضادة الفطرية المفترزة بواسطة الكائن المرض .

يمكن القول باختصار ، أن سلالة *R. solani* المذكورة ، تفرز مشتقات كيومازين والتي تثبط نمو عزلة الفطر تريكوديرما المذكورة ، ولكن هذا التثبيط يكون منخفضاً إلى حد ما نتيجة التضاد مع المركبات التي تفرزها سلالة الفطر تريكوديرما .

### تحسين كفاءة *T. harzianum* فى المقاومة الحيوية لأمراض بعض الاعشاب

تعتبر السلالة 22-1295 من الفطر *T. harzianum* عامل مقاومة حيوية عالية الكفاءة لعدد من الأمراض الفطرية . وجد أن استعمال المعلق الجرثومى لهذه السلالة ، رشاً على النباتات العشبية ، يخفف بشكل معنوى أمراض ، عفن الجذور ، البقعة البنية ، والبقعة الدلارية فى الأعشاب الزاحفة فى الصوبا الزجاجية والحقول العامة . تكون المقاومة أفضل عندما يضاف Triton X-100 بنسبة ١ ، % إلى محلول المعلق المائى .

عندما يطبق الرش أسبوعياً ، فإن معاملة المقاومة الحيوية تكون مشابهة فى تأثيرها ، لتأثير المبيدات الفطرية القياسية . أما عند استعمال تحضيرات فطر المقاومة على شكل حبيبات توضع فى أكوام صغيرة ، أيضاً فإنها تخفف حدوث المرض معنوياً بالنسبة للأمراض الثلاثة المذكورة سابقاً بالإضافة إلى تحسين نوعية المسطحات العشبية .

تزداد تجمعات الفطر *Trichoderma sp.* فى منطقة الجذور من ١٠-١٠٠ ضعف بعد المعاملة مقارنة مع المنطقة التي لم تعامل . وعلى أية حال فإن السلالة 22-1295 تكون موجودة بمستويات عالية على أوراق الأعشاب فقط بعد المعاملة رشاً . وبشكل عام يمكن القول أن السلالة المذكورة تمتلك كفاءة عالية فى تواجدها فى منطقة الرايزوسفير والمجموع

الخضري (جدول رقم ٧٩) . يمكن الحصول على مقاومة الأمراض بكفاءة عالية عند استعمال طريقة معاملة التربة متبوعة بالرش على المجموع الخضري .

جدول رقم ٧٩ : تجمعات السلالة 22-1295 من الفطر *T. harzianum* في منطقة الرايزوسفير وفي المجموع الخضري لبعض الأعشاب الزاحفة ، المعاملة بهذه السلالة رشاً على الأوراق أو على شكل حبيبات على التربة .

| التجمعات على المجموع الخضري |            | التجمعات في الرايزوسفير |            | المعاملة           |
|-----------------------------|------------|-------------------------|------------|--------------------|
| تربة طبيعية                 | تربة معقمة | تربة طبيعية             | تربة معقمة |                    |
| ٤١٠ × ٦                     | ٣١٠ × ٣,٦  | ٤١٠ × ١,٨               | ٣١٠ × ٢,٩  | كنترول             |
| ٤١٠ × ٧                     | ٣١٠ × ٦,٧  | ٥١٠ × ١                 | ٥١٠ × ٢,٤  | المعاملة بالحبيبات |
| ٥١٠ × ٣                     | ٥١٠ × ٤    | ٥١٠ × ١,٨               | ٥١٠ × ١    | رشاً على الأوراق   |

ملاحظات على الجدول :

١ - أخذت القياسات بعد أسبوع من الرش ، حيث كان معدل وجود الفطر تريكوديرما في التربة (٢-٥) × ٣١٠ وحدة تكوين مستعمرات/غرام في التربة غير المعاملة بالحرارة وأصبح ١ × ١٠ بعد التعقيم في بداية التجربة . بعد الرش فإن مستويات وحدة تكوين مستعمرات بعد ٣ ساعات من الاستعمال كانت ٥ × ١٠ وحدة تكوين مستعمرات/غرام تربة وحوالي ١ × ١٠ وحدة تكوين مستعمرات/غرام من الأوراق . كانت تخلط حبيبات مخضرات الفطر مع التربة سواء معقمة أو غير معقمة قبل زراعة البذور . عندما تصبح النباتات ذات عمر عشرة أيام كانت ترش بالفطر .

### عزلات الفطر تريكوديرما المتطفلة على الفطر *Sclerotium rolfsii*

مقدمة :

يعتبر الفطر *S. rolfsii* احدى الكائنات الممرضة الفطرية الكامنة في التربة ، وهو من الفطريات غير المتخصصة ، وله أهمية عالمية واسعة ، ويهاجم مدى عوائلها واسع قد يصل إلى حوالي ٥٠٠ نوع نباتي . تكون المقاومة الحيوية الناجحة لهذا الفطر عن طريق تلويث الحقول بمزارع من الفطر *Trichoderma sp.* . كما هو معروف فإن فطر التريكوديرما يهاجم الأجسام الحجرية لكل من *S. rolfsii* ، *Botrytis cinerea* و *Sclerotinia sp.* ويقضى عليها ويجعلها غير ذات أهمية .

## نتائج الأبحاث :

جهزت ٤٤ عزلة من الفطر تريكوديرما ، تتبع ثمانية أنواع ، درس تأثيرها على عزلة واحدة من الفطر الممرض *S. rolfsii* النامية فى بيئة PDA . أنتجت الأجسام الحجرية فى المعمل وذلك بعد حقن أطباق بتري تحتوى بيئة PDA بلقاح من الفطر *S. rolfsii* ثم حضنت الأطباق على حرارة ٢٥ م لمدة ٤ أسابيع . أخذت الأجسام الحجرية ذات الأشكال المتماثلة وخزنت واستعملت فى التجارب .

أجريت عملية تطهير لسطوح الأجسام الحجرية باستعمال كلوراكس ٢ ٪ لمدة خمسة دقائق ثم غسلت بماء معقم لإزالة ما يعلق بها من هيفات ، ثم عرضت بعد ذلك للإصابة بعزلات الفطر تريكوديرما عن طريق وضع ٤٠-٥٠ جسم حجرى حول أطراف مستعمرات الفطر تريكوديرما النامية فى أطباق بتري على بيئة PDA . بعد ٢٤ ساعة من التحضين على حرارة ٢٥ م كان الفطر تريكوديرما قد غطى فى نمو الأجسام الحجرية . أخذت الأجسام الحجرية واجرى لها عملية تنظيف ثم وضعت فى أطباق بها بيئة مشبعة لنمو التريكوديرما .

تبين من الدراسة السابقة أن عزلات الفطر تريكوديرما تختلف معنوياً فى مقدرتها على إصابة ، هرس وقتل الأجسام الحجرية للفطر *S. rolfsii* . كانت تتراوح نسبة القتل فى الأجسام الحجرية من صفر-١٠٠ ٪ ، معتمدة على نوع الفطر الذى تتبعه هذه العزلة . من بين ٤٤ عزلة تبين أن هناك ١٤ عزلة تستطيع أن تصيب وتقتل الأجسام الحجرية كلها ، هناك ١٣ عزلة تستطيع أن تقتل بعض الأجسام الحجرية و ١٧ عزلة لم تستطع أن تهاجم الأجسام الحجرية جدول رقم ٨٠ .

من بين ١٣ عزلة من الفطر *T. harzianum* وستة عزلات من كل من *T. hamatum* و *T. koningii* جعلت الجسم الحجرى المصاب إما ناعماً وإما طرى جداً . من بين الأنواع الأخرى فإن *T. auroviride* فقط هو الذى جعل الجسم الحجرى ناعماً جداً ، بينما الأنواع الأخرى ، تركت الجسم الحجرى إما صلباً أو صلباً جداً . عزلات *T. harzianum* بشكل عام ، قتلت الأجسام الحجرية وجعلتها ناعمة . عند ملاحظة الشكل الخارجى للجسم الحجرى ، تبين أن هيفات الفطر تريكوديرما تخترق الجزء المصاب من الجسم الحجرى وتتكاثر داخله مكونة جراثيم . مثل هذا الاختراق يتكرر كثيراً فى الأجسام

الحجرية المصابة . أما فى حالة الجسم الحجرى الذى بقى صلباً فإن استعمار هذه الأجسام كان قليلاً والاختراق نادراً .

## تطفل الفطر تريكوديرما على الفطر

### *Botryodiplodia theobromae*

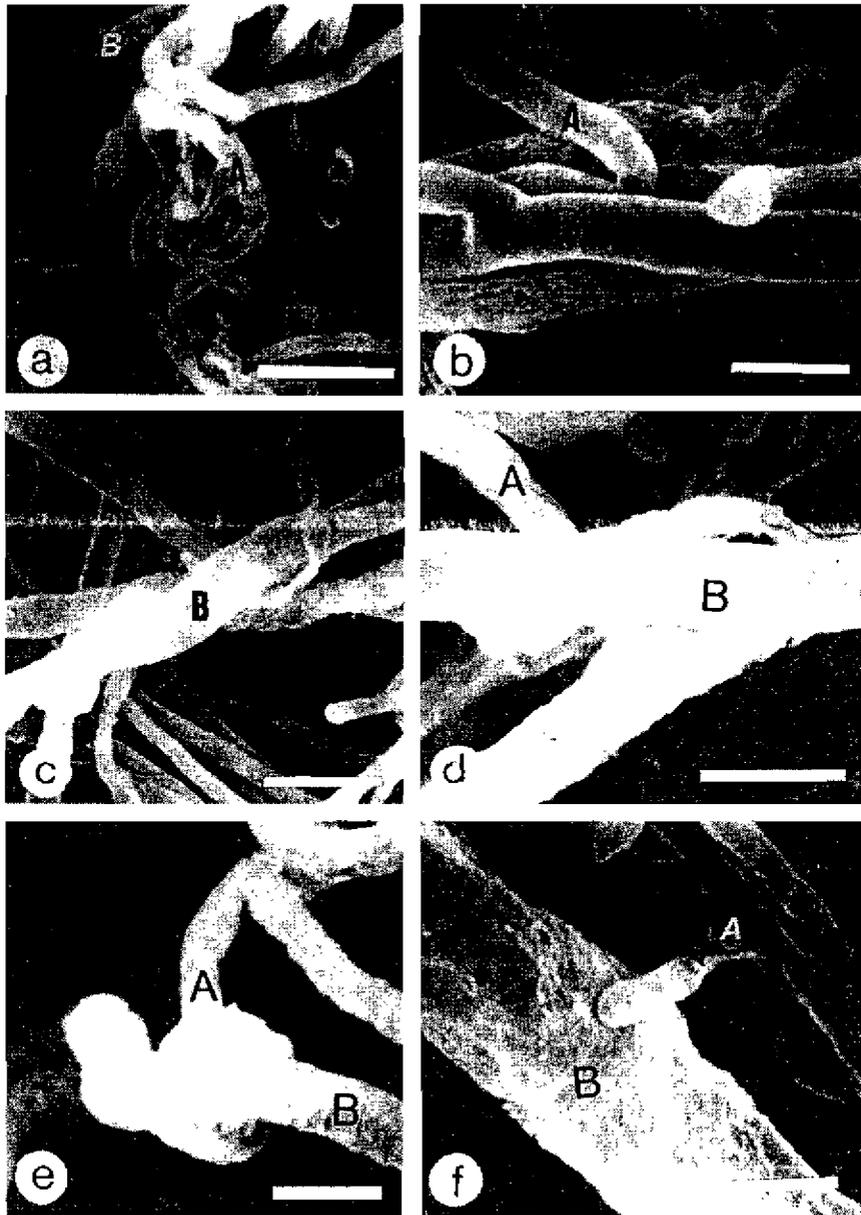
درس التطفل الفطرى ، لأنواع مختلفة من الفطر تريكوديرما ، ضد الكائن الممرض الخطير *B. theobromae* بواسطة Scanning electron microscopy . أظهرت الملاحظات الميكروسكوبية أن النمو الفطرى فى المزارع المزدوجة ، يظهر أن معظم العزلات تكون اتصال هيفى مع الكائن الممرض خلال يومين بعد الحقن ، مؤدياً إلى تثبيط نمو الكائن الممرض . وعلى أية حال فإن *T. viride* Tv-4 ، *T. hamatum* ، و *T. pseudokoningii* ، تثبط نمو الكائن الممرض قبل الاتصال الهيفى وتظهر منطقة Inhibition zone بين مستعمرات كلا الفطرين . أظهرت الاختبارات بالمسح الالكترونى أنه فى حالة التفاعل الهيفى ، أن التأثير القوى للفطريات المضادة (*T. viride* Tv-1) و Tv-3 و *T. harzianum* Th-1 و Th-2 و *T. longibrachiatum* ضد الفطر *B. theobromae* ، يتأسس أما عن طريق الالتفاف حول الهيفى أو عن طريق اختراق الخلايا الهيفية بتشكيلات خطافية (كُلاية) ، أعضاء التصاق وتركيبات تشبه أعضاء الامتصاص . الشكل رقم ١٠ يوضح طرق تسلسل طرق التطفل هذه .

جدول رقم ٨٠ : تفاعل سلالات الفطر تريكوثيرما مع الفطر *S. rolfii*.

| Isolate No. | <i>Trichoderma</i> spp.   | التجارب المفضلة |    |    |    |    |    | % Sclerotia killed | Degree of maceration |
|-------------|---------------------------|-----------------|----|----|----|----|----|--------------------|----------------------|
|             |                           | D               | V  | NV | BC | R  | C  |                    |                      |
| T005        | <i>T. harzianum</i>       | -               | +  | -  | -  | +  | +  | 0.0                | S                    |
| T040        | <i>T. harzianum</i>       | -               | -  | -  | +  | -  | -  | 100.0              | VS                   |
| T126        | <i>T. harzianum</i>       | -               | -  | -  | +  | -  | -  | 100.0              | S                    |
| T127        | <i>T. harzianum</i>       | -               | -  | -  | -  | +  | -  | 13.0               | S                    |
| T165        | <i>T. harzianum</i>       | +               | -  | +  | +  | +  | -  | 100.0              | VS                   |
| T166        | <i>T. harzianum</i>       | +               | -  | +  | +  | +  | -  | 4.6                | H                    |
| T171        | <i>T. harzianum</i>       | +               | -  | -  | +  | +  | -  | 100.0              | S                    |
| T250        | <i>T. harzianum</i>       | +               | -  | -  | +  | -  | -  | 100.0              | VS                   |
| T257        | <i>T. harzianum</i>       | -               | -  | -  | +  | -  | -  | 86.7               | S                    |
| T295        | <i>T. harzianum</i>       | -               | -  | -  | +  | -  | -  | 100.0              | VS                   |
| 144         | <i>T. harzianum</i>       | -               | -  | -  | nt | nt | nt | 100.0              | S                    |
| 146         | <i>T. harzianum</i>       | -               | -  | +  | nt | nt | nt | 100.0              | S                    |
| 268         | <i>T. harzianum</i>       | +               | -  | -  | nt | nt | nt | 100.0              | S                    |
| 390         | <i>T. harzianum</i>       | +               | -  | -  | nt | nt | nt | 91.7               | H                    |
| 391         | <i>T. harzianum</i>       | +               | -  | -  | nt | nt | nt | 91.2               | S                    |
| T024        | <i>T. hamatum</i>         | +               | +  | -  | +  | +  | -  | 100.0              | S                    |
| T047        | <i>T. hamatum</i>         | +               | -  | -  | -  | +  | +  | 61.9               | H                    |
| T049        | <i>T. hamatum</i>         | -               | -  | -  | -  | +  | +  | 0.0                | H                    |
| T093        | <i>T. hamatum</i>         | -               | -  | -  | -  | +  | +  | 100.0              | H                    |
| T095        | <i>T. hamatum</i>         | -               | -  | -  | -  | +  | +  | 87.5               | S                    |
| T096        | <i>T. hamatum</i>         | -               | -  | -  | +  | +  | -  | 0.0                | H                    |
| T099        | <i>T. hamatum</i>         | -               | -  | -  | -  | +  | +  | 0.0                | VH                   |
| T107        | <i>T. hamatum</i>         | -               | -  | -  | -  | +  | +  | 40.9               | H                    |
| T134        | <i>T. hamatum</i>         | -               | -  | -  | +  | +  | +  | 0.0                | VH                   |
| T221        | <i>T. hamatum</i>         | +               | -  | -  | -  | +  | -  | 0.0                | VH                   |
| T292        | <i>T. hamatum</i>         | -               | -  | -  | -  | +  | -  | 0.0                | S                    |
| T309        | <i>T. hamatum</i>         | -               | +  | -  | +  | +  | -  | 79.0               | VS                   |
| 354         | <i>T. hamatum</i>         | -               | -  | -  | nt | nt | nt | 100.0              | VS                   |
| 355         | <i>T. hamatum</i>         | -               | -  | -  | nt | nt | nt | 0.0                | H                    |
| T007        | <i>T. koningii</i>        | -               | -  | -  | -  | -  | -  | 100.0              | S                    |
| T017        | <i>T. koningii</i>        | -               | -  | -  | -  | -  | -  | 0.0                | S                    |
| T026        | <i>T. koningii</i>        | -               | -  | -  | +  | -  | -  | 0.0                | VH                   |
| T029        | <i>T. koningii</i>        | -               | -  | -  | +  | -  | -  | 0.0                | S                    |
| T043        | <i>T. koningii</i>        | -               | -  | -  | +  | +  | -  | 0.0                | VS                   |
| T116        | <i>T. koningii</i>        | -               | -  | -  | +  | -  | +  | 52.2               | H                    |
| T119        | <i>T. koningii</i>        | -               | -  | -  | -  | +  | +  | 0.0                | VH                   |
| T235        | <i>T. koningii</i>        | -               | -  | -  | +  | -  | -  | 79.2               | VH                   |
| T236        | <i>T. koningii</i>        | -               | -  | -  | +  | -  | -  | 85.7               | S                    |
| 356         | <i>T. koningii</i>        | -               | -  | -  | nt | nt | nt | 100.0              | VS                   |
| 357         | <i>T. longibrachiatum</i> | -               | -  | -  | nt | nt | nt | 0.0                | VH                   |
| 358         | <i>T. polysporum</i>      | -               | nt | nt | nt | nt | nt | 0.0                | VH                   |
| 359         | <i>T. pseudokoningii</i>  | -               | -  | -  | nt | nt | nt | 0.0                | VH                   |
| 361         | <i>T. auroviride</i>      | -               | -  | -  | nt | nt | nt | 93.8               | VS                   |
| 362         | <i>T. oiluliferum</i>     | -               | -  | -  | nt | nt | nt | 0.0                | VH                   |

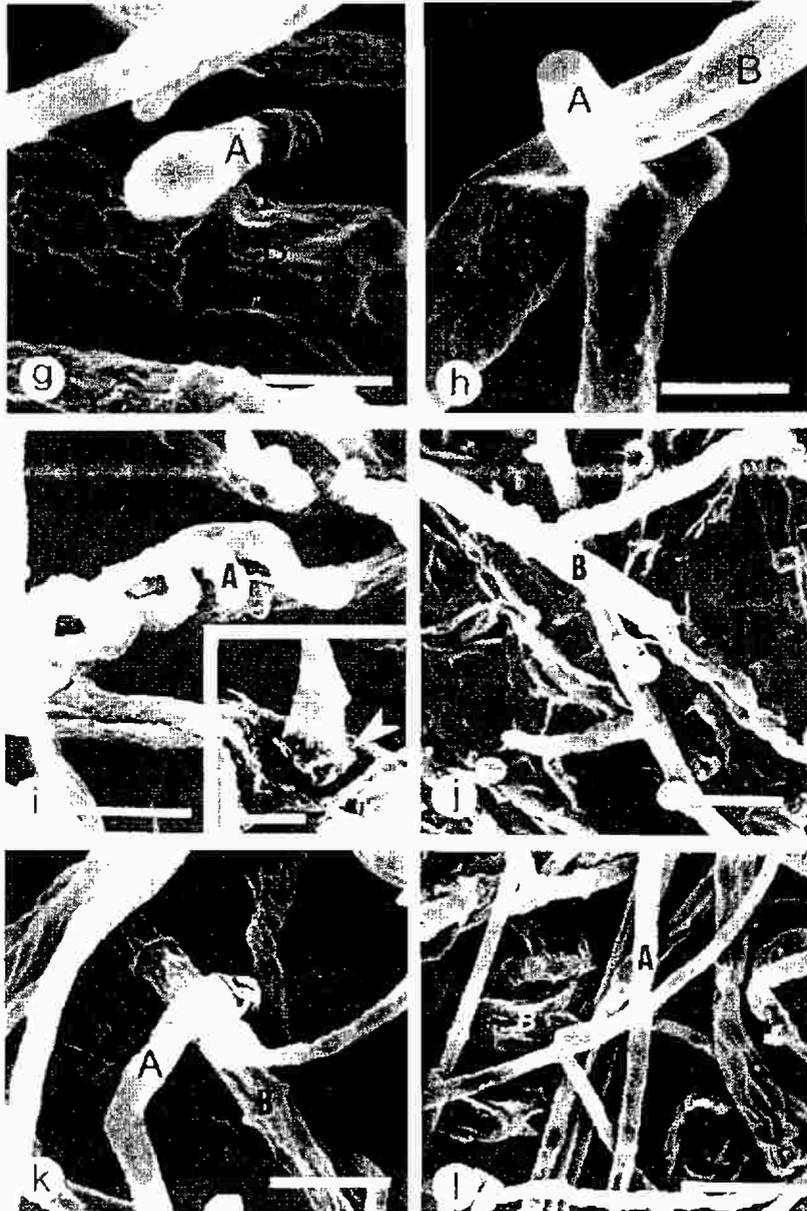
\* D : Dual culture; V : Volatiles; NV : Non-volatiles; BC : *Botrytis cinerea*;

R : *Rhizoctonia*; C : Cold tolerance; ; S : soft; VS : very soft ; H : hard ; VH : Very hard.



شكل رقم ١٠ : دراسة بالميكروسكوب الالكتروني على تطفل الفطر تريكوذيروما على الفطر

*Botryodiplodia theobromae*



تابع شكل رقم ١٠

توضيح الأشكال :

A : الفطر المتطفل : *Trichoderma sp.*

B : الفطر المتطفل عليه : *Botryodiplodia theobromae*

a : أفرع قصيرة من *T. viride* سلالة A. Tv-1 محيطة بهيئا الفطر المتطفل عليه B

b : تركيب قصير يشبه المص متفرع من نفس السلالة ملتصق مع هيئا الفطر المتطفل عليه .

c و d : العزلة Tv-3 من الفطر المتطفل *T. viride* ملتفة حول هيئات الفطر المتطفل عليه بزوايا مختلفة .

e : هيئا Tv-3 ملتفة بكثافة حول هيئات الفطر المتطفل عليه مشكلة عقدة .

f : تركيب يشبه الخطاف من Tv-3 ملتصق مع هيئا الفطر المتطفل عليه .

g : تركيب يشبه عضو الالتصاق مكون من قبل العزلة Th-1 تضغط وتعصر هيئا الفطر المتطفل عليه .

h : خطاطيف من السلالة Th-2 مخترقة هيئا الكائن المتطفل عليه .

I : منظر يشبه البترة على القمة (السهم) بعد أن تصبح متصلة مع هيئا الفطر المتطفل عليه .

J : انفجار وتخطم هيئا الفطر المتطفل عليه بعد التداخل مع Th-2 .

K : تركيب يشبه عضو الالتصاق مظهراً *T. longibrachiatum* ممسكاً هيئا الفطر المتطفل عليه .

l : تجعد ، انفجار وانهيار هيئات الفطر المتطفل عليه بعد إختراقه بالفطر *T. koningii* .

مقياس الرسم : ٥ ، ٢ ، ٤ ، ٢ ، ٤ ، ١ ، ٥ ، ٢ ، ٣ ، ١ ، ٤ ، ٥ ، ٨ ميكرومتر بالترتيب .

## II : الجنس *Clonostachys*

الفطر *Gliocladium roseum*

الاسم الجديد *Clonostachys rosea*

### مقدمة

الكائنات الحية الدقيقة المضادة ، لها دور كبير في مقاومة كثير من أمراض النبات . لقد أجريت تجارب كثيرة لمقاومة مرض العفن الرمادى Gray mold وأمراض أخرى متسببة عن الكائن المرض المهلك *Botrytis cinerea* فى الفواكه والخضروات والمحاصيل الحقلية ، غراس أشجار الغابات ونباتات الزينة ومحاصيل أخرى . إن ظاهرة التضاد الميكروبي ضد الفطر *B. cinerea* من أهم طرق المقاومة الحيوية الملائمة ، وذات كفاءة عالية فى الوقت الحالى ، ويمكن أن تكون مترافقة مع طرق المقاومة الأخرى ، أو تستعمل لوحدها ، وذلك حسب شدة المرض والظروف البيئية ، وبالتالي فهى تساعد فى عدم الاعتماد على استعمال المبيدات الفطرية الكيماوية . كذلك فإن ظهور سلالات من الفطر *B. cinerea* مقاومة للمبيدات الفطرية وغير ملائمة لمقاومة العائل ، تشارك فى جعل كثير من المحاصيل الحقلية غير مستقرة ومعرضة لخطر الهجوم من قبل الكائن المرض . كذلك فإن المقاومة الحيوية بالكائنات الحية الدقيقة ، تبدو كطريقة لمنع أية أخطار مترافقة ، تحدث للعمال من جراء استعمال المبيدات الفطرية الكيماوية وكذلك لاستبعاد الأثر المتبقى السام الذى يبقى فى المواد الغذائية ، وتؤثر على صحة الإنسان أو الحيوان بالإضافة إلى أضرار البيئة .

إن الفطر الخيطى *Gliocladium roseum* ، قد تبين بأنه فعال ومتعدد التأثيرات ضد الفطر *B. cinerea* ، وخاصة عند تفاعله مع عوامل أخرى ظاهرة ، مما يؤكد تحسن طرق وقاية النبات من الأمراض بالمقاومة الحيوية . وفيما يلى مقالة طويلة تتعلق بالفطر *G. roseum* وتوضيح الأدوار التى يقوم بها فى النظام الطبيعى فى المحاصيل ودوره كعامل مقاومة حيوية .

### الشكل الخارجى والتصنيف :

الفطر *G. roseum* الاسم المرادف *Nectria ochroleuca* ولقد وضع له اسم جديد هو *Clonostachys rosea* ، وهو من الفطريات الإسكية المسماة Hypocreales وواحد من الـ hyphomycete غير العادية ، التى تنتج جراثيم كونيديية ، ذات خلية واحدة ، على

نوعين متميزين من الحوامل الكونيدية . النوع الأول متفرع على شكل Penicillately (خصل) والثاني متفرع على شكل سوارى Verticillately . تكون مستعمرات الفطر على بيئة الاجار بشكل عام ، مبيضة يرتقالية أو ذات لون سلاموني . يعتبر الفطر مختلف جنسياً عن عامل المقاومة الحيوية *Gliocladium virens* والذي يسمى الآن *Trichoderma virens* ويختلف أيضاً عن النوع النموذجي المسمى *Gliocladium penicillioides* . ولقد اقترح العالم Domosch et al سنة ١٩٨٠ أن الفطر *G. roseum* يدخل في الجنس *Clonostachys* واقترح بأن يشار إليه كمجموعة من الأنواع . ولقد وافقت لجنة تسمية الفطريات سنة ١٩٩٩ علي الاقتراح المقدم من قبل العالم السابق وأعطى هذا الفطر الاسم *Clonostachys rosea* .

### البيئة :

الفطر *C. rosea* شائع الوجود في الظروف البيئية المتطرفة غير العادية والمنحرفة عن الوضع الطبيعي ، فمثلاً يتواجد الفطر في المناطق الأستوائية والمدارية والمعتدلة والمناطق القطبية والمناطق الصحراوية في العالم . ولقد ذكر بأنه يتواجد في المناطق المزروعة والمناطق العشبية والغابات الخشبية والبساتين العادية ، وأراضى المروج والمياه العذبة والأراضى الساحلية ؛ خاصة تلك المتعادلة والقريبة إلى القلوية . يكون الفطر *C. rosea* غالباً مترافقاً مع حويصلات النيماتودا *Heterodera sp.* ، *Globodera sp.* وأنواع أخرى من النيماتودا في التربة وكذلك مع الأجسام الحجرية للفطريات الآتية :

- 1 - *Sclerotinia sclerotiorum*
- 2 - *Phymatotrichum omnivorum*
- 3 - *R. solani*
- 4 - *Botrytis spp.*
- 5 - *Verticillium spp.*

وفطريات أخرى في التربة وعلى الأجزاء النباتية . ومنذ أوائل ستينيات القرن الماضي ، فإن الفطر *C. rosea* قد حصل على شهرة عالمية كفطر متطفل mycoparasite على كثير من الفطريات .

كذلك فإن هناك أشكالاً متعددة جديدة بالاهتمام من الفطر *C. rosea* تكون مرافقة للجذور ، السيقان ، الأوراق ، الثمار وبذور النباتات . يتواجد الفطر على سطوح النبات مثل

المجال الورقى فى الفراولة و سطح الميكوريزا فى نبات *Abies alba* . وتشير التقارير إلى أن الفطر يتواجد بكثرة ، ضمن المجموع الخضرى ، والجذور الميتة والتي فى سن الشيخوخة لكثير من أنواع النباتات ، وفى النباتات التى أصبحت ضعيفة عن طريق الظروف غير المناسبة، مثل استعمال مبيدات الحشائش عليها أو المهاجمة من قبل الأمراض .

من المعروف أن الفطر *C. rosea* قادر على استعمار أجزاء نبات فول الصويا دون انتاج أعراض ، حيث تظهر هذه الأجزاء سليمة ، مثل الجذور ، السيقان ، القرون ، والبذور . وكذلك جذور البرسيم الأحمر وأوراق الفراولة وتوت العليق . فى هذه الحالات يبدو الفطر بوضوح مستعمراً العائل كمتطفل غير مسبب للمرض ، فى فول الصويا ، على الأقل ، يكون ترافقه جهازياً . هناك بعض التقارير تشير إلى أن الفطر *C. rosea* كان ممرضاً لثمار التفاح ، درنات البطاطس ، بادرات الصنوبر ، *Exacum affine* والفول البلدى ، إلا أن هذه التقارير غير مؤكدة من قبل كثير من الباحثين . الفطر الذى يطلق عليه الاسم القديم للفطر *C. rosea* الذى سبق ذكره *N. ochroleuca* يوجد غالباً وفى كثير من الأحيان على أفرع الأشجار الميتة حديثاً ، وفى أحيان أخرى يتواجد على الأعشاب والأنسجة اللحمية فى النباتات والفطريات .

### اختيار الفطر *C. rosea* فى المقاومة الحيوية

إن عملية اختيار الكائن الحى الدقيق فى المقاومة الحيوية ، من الأمور الصعبة ، حيث تكون أمام الباحث أعداد مذهلة من العزلات الميكروبية ، والتي تستطيع أن تقوم بدور المقاومة الحيوية ، ويكون من الصعوبة تبرير أو تثبيت التقييم ، أو تحديد الكفاءة المثلى لأى منها فى المقاومة الحيوية ، حيث إن هذه الأمور تحتاج إلى الحصر الطبيعى للميكروب ويتطلب امكانية استعمال الميكروب فى الانتاج التجارى .

فى حالة اختيار الكائنات الدقيقة المضادة للفطر *B. cinerea* ، فإن الباحثين قد أيدوا المنطق القائل بالتكيف البيئى للميكروب مع العائل النباتى ، حيث إن هذا يكون مفيداً للحصول على مقاومة حيوية مفيدة وفعالة لمدة طويلة فى نظام المحاصيل ، وبناء على ذلك تستعمل نباتات العائل كمصدر رئيسى للكائنات المختيرة . تشمل طرق الاختيار الفطريات الخيطية ، الخمائر والبكتيريا ، التى تعزل من الأوراق الميتة والحية ومن السيقان والأزهار والثمار ، من نباتات العائل الخالية من مبيدات الآفات ، وكذلك فإن طرق الاختيار تشمل

الكائنات الدقيقة رمية التغذية ، الكائنات الممرضة الضعيفة والكائنات سطحية المعيشة وداخلية المعيشة غير الممرضة . تستعمل الكائنات الواقعة تحت الاختبار ، على نباتات الصوبا الزجاجية التي تفتقر إلى التنوع المرغوب في الميكوفلورا ، حيث ترش بالمعلق المائي من التربة وتحضن في جو عالي الرطوبة قبل إعادة عزل السلالة ، وكذلك فإن نباتات العائل بدورها ، تعمل كمادة اختبار ومادة تفاعل للكائنات الدقيقة الطبيعية ، وبالتالي تضيق مجال الكائنات الدقيقة للتقييم في اختبارات الاختيار . بالنسبة لبعض العوائل ، فإن هذا المجال يمكن تضيقه كثيراً ، وذلك عن طريق إضافة جراثيم كونيدية من الفطر *B. cinerea* إلى النباتات ، وأخيراً إعادة اكتشاف الكائنات الدقيقة ، فقط ، من أجزاء النسيج التي فشل الكائن الممرض في التجريم عليها ، إلا أن الفطر كان قد تم عزله مراراً من الأنسجة الحية والميتة تقريباً ، من جميع العوائل المختبرة .

بعد تطبيق الإجراءات العملية في الاختيار من بين مئات الكائنات الدقيقة المختبرة ضد الفطر *B. cinerea* . تبين أن الفطر *C. rosea* ذو فعالية ضد الفطر الممرض *B. cinerea* على كثير من العوائل النباتية منها ، الفراولة ، العليق ، Black spruce ومدى واسع من نباتات الأزهار والزينة والخضروات المنتجة في الصوبات الزجاجية شاملة البيجونيا ، جيرانيم ، بونستيا ، بخور مريم *Exacum affine* ، الطماطم ، الخيار والفلفل . وبشكل عام فإنه في جميع الحالات فإن الفطر *C. rosea* كان مشابهاً أو أكثر في فعاليته من تأثير المعاملات بالمبيدات الفطرية في الأوراق ، القنابات الزهرية ، السيقان ، الأزهار والثمار ، وبالتالي في هذه الأيام فإن الفطر *C. rosea* يستعمل تجارياً في مقاومة أمراض *B. cinerea* في الصوبات الزجاجية .

### العوامل المؤثرة على كفاءة *C. rosea*

#### ١ - طور نمو أعضاء العائل :

المرحلة التي تمر بها الأوراق ابتداء من أول امتدادها في المراحل الأولى من النمو ، حتى الوصول إلى طور الشيخوخة ، بشكل عام ، تكون ذات تأثير بسيط على فعالية الفطر *C. rosea* ضد الفطر الممرض *B. cinerea* ، في المجموع الخضري لكل من الفراولة ، البيجونيا ونبات بخور مريم . الأوراق التي بدأت في الامتداد والتوسع في البيجونيا وبخور مريم، تكون أقل قابلية لاستقبال الفطر الممرض والتي تقاوم فيها الإصابة (إذا حدثت) حيويًا

بصعوبة أو يصعب قياس نجاح المقاومة الحيوية فيها . في العوائل الثلاثة المذكورة كانت كفاءة المقاومة الحيوية ٣٠-٧٠ ٪ أقل في الأوراق في سن الشيخوخة ، بالمقارنة مع الأوراق التي في مرحلة قبل الشيخوخة ، وتكون صفراً تماماً في الأوراق الميتة .

المقاومة الحيوية للفطر *B. cinerea* في الأزهار ، تمثل تحدياً خاصاً بسبب تعقيد نمو ، تكشف وتركيب الأزهار . وبشكل عام فإن الأعضاء المختلفة في الأزهار المتكشفة والتي في مرحلة الشيخوخة لمدة مختلفة من الزمن ، تكون مختلفة القابلية للإصابة بالفطر *B. cinerea* ، وذات تفاعلات مختلفة بالكائنات الميكروبية المضادة . عند دراسة تأثير عمر الزهرة على المقاومة الحيوية للفطر *B. cinerea* ، وجد في دراسات على الأزهار المتفتحة جزئياً ، كاملة التفتح والأزهار في طور الشيخوخة لنبات البيجونيا التي قد حققت بالكائن المرض (٦١٠ جرثومة كونيديا/مل) ثم الحقن بالكائن المضاد بعد ٢٤ ساعة (إما بالفطر *C. rosea* أو الفطر *T. koningii* بتركيز ٧١٠ جرثومة كونيديا/مل) ، وجد أن هذه التركيزات من الكائن المضاد لا تؤثر على القابلية للإصابة بالفطر المرض في الأطوار المتتابعة لتكشف الزهرة . وجد أن الفطر *C. rosea* يبط الكائن المرض بحوالى ، صفر في الأزهار المتفتحة جزئياً ، ٤٩ ٪ في الأزهار كاملة التفتح ، ٦٨ ٪ في الأزهار التي في طور الشيخوخة ، بينما *T. koningii* كانت مقدرته على التثبيط بحوالى ٩٣-٩٥ ٪ في المراحل الثلاثة .

## ٢- تركيز اللقاح :

إن معرفة تركيز اللقاح للفطر *C. rosea* وعلاقتها في مقاومة الفطر المرض *B. cinerea* من الأساسيات المهمة لوضع أسس مناسبة لتوصيات استعمال المقاومة الحيوية في أمراض المحاصيل . كما هو متوقع فإن العلاقات تختلف كثيراً مع كل من ، المحصول ، نوع وعمر العضو النباتي ، تركيز الكائن المرض ، ظروف المناخ (الطقس المحيط بالنبات) وعوامل أخرى . وعن طريق الاستدلال فإن أفضل تركيز من الفطر *C. rosea* يختلف حسب المحصول ووقت الاستعمال والمكان الذى يستعمل عليه ، سواء على المجموع الخضرى ، الأزهار والثمار . وكما هو شائع فى التعامل مع الأمراض ، فإن الاعتماد على تركيز اللقاح للفطر *C. rosea* الذى يعطى مقاومة كافية ضد الفطر المرض *B. cinerea* فى المحصول ، هو مطلب حتمى يجب معرفته .

الدراسات التي أجريت تحت ظروف متحكم بها ، زدتنا بصورة منظورة ، لمتطلبات اللقاح من الفطر المضاد ، لمقاومة الفطر الممرض في عديد من المحاصيل . عند حقن المجموع الخضري والأزهار في البيجونيا ونبات بخور مريم بتركيزات مختلفة من الفطر الممرض (من صفر إلى  $10^6$  جرثومة كونيديّة/مل) ومن الفطر المضاد بتركيزات (من صفر إلى  $10^8$  جرثومة كونيديّة/مل) ، في جميع الاتحادات تم الحصول على مقاومة حيوية جيدة ، أساساً عندما كان تركيز الكائن المضاد مشابهاً أو أكثر من ذلك التركيز في الكائن الممرض . في دراسة مماثلة على العليق ، فإن المستويات العالية من المقاومة (٩٠-١٠٠ %) قد تم الحصول عليها في الأوراق لجميع الاتحادات من  $10^3$  إلى  $10^6$  جرثومة كونيديّة من الفطر الممرض/مل و  $10^4$  إلى  $10^8$  جرثومة كونيديّة/مل من الفطر المضاد ، أما في السيقان ، الأُسدية والمياسم فقط عندما يكون تركيز الكائن المضاد  $10$  أو  $100$  ضعف تركيز الكائن الممرض . ومن غير المتوقع فإن الفطر المضاد على تركيز  $10^8$  جرثومة كونيديّة/مل غالباً ما تكون أقل فعالية من تركيز  $10^7$  جرثومة كونيديّة في الأُسدية والمياسم ، لوحظت أيضاً حالة واحدة في المجموع الخضري لشتلات البيسيه السوداء في غرف الإنبات . يبدو واضحاً أنه ليس من المهم زيادة التركيزات المثلى للفطر المضاد للمقاومة الحيوية في المحاصيل ، خاصة عندما تكون الظروف ملائمة لبقاء الكائن المضاد . في الصوبات الزجاجية وغرف الإنبات ، فإن استعمال تركيز  $10^7$  جرثومة كونيديّة/مل من الفطر المضاد يثبط بشدة الفطر الممرض بتركيز  $10^6$  جرثومة كونيديّة/مل في مختلف أعضاء نبات البيجونيا ، بخور مريم ، *Exa-cum* ، جيرانيم ، الجيربارا ، الخيار ، الفلفل ، العليق ، الفراولة ، الطماطم وعوائل أخرى كثيرة . في كل حالة فإن التركيز من الكائن الممرض كان كافياً ليحدث مرضاً خطيراً ومستمرّاً في غياب الكائن المضاد .

إن تركيز اللقاح من  $10^6$  إلى  $10^8$  جرثومة كونيديّة/مل من الفطر المضاد ، عادة ، يعطى مقاومة جيدة للفطر الممرض في المحاصيل في الحقل وفي الصوبا الزجاجية . اللقاح المحتوى  $10^6$  جرثومة كونيديّة/مل من الفطر ، المضاد عادة ما يكون كافياً في الفراولة ، البيجونيا ، وبخور مريم . أما تركيز  $10^7$  جرثومة كونيديّة/مل من الفطر المضاد يعطى نتائج أفضل في العليق ، أما تركيز  $10^7 - 10^8$  كان أقرب للموضع الأمثل للمقاومة الحيوية في البيسيه السوداء .

وجد في تجارب أخرى أن استعمال الفطر *C. rosea* بتركيز  $5 \times 10^6$  جرثومة كونيديّة/مل تثبط مرض لفحة الأوراق المتسبب عن الفطر *B. squamosa* على البصل في الحقل بنسبة ٥٠-٥٨ % .

### ٣ - الحرارة :

أجريت دراسات على الحرارة وعلاقتها مع فعالية المقاومة الحيوية التى يقوم بها الفطر *C. rosea* ضد الفطر الممرض *B. cinerea* فى خمسة عوائل . بشكل عام فإن مستوى المقاومة الحيوية يكون عالياً على ٢٠-٢٥ م ، وأيضاً على ٣٠ م فى العوائل التى فيها يمكن الحصول على قياس للإصابة ، ولكنها كانت تدرجياً أقل من ١٥ و ١٠ م . درجات الحرارة المنخفضة تقلل المقاومة الحيوية بشكل هامشى (الحد الأدنى) فى الأوراق فى نباتات الفراولة والبيجونيا وفى أسدية نبات العليق ، ولكنها تقلل كفاءة المقاومة الحيوية بشكل متوسط فى أوراق العليق ، بخور مريم والجيرانيوم وفى بتلات البيجونيا ، ولكن بشكل عال وواضح فى بتلات بخور مريم والجيرانيوم . التأثيرات المختلفة لدرجة الحرارة على المقاومة الحيوية فى الأعضاء المختلفة فى العائل ، كانت واضحة فى أربعة عوائل . ومن الدراسات المستفيضة على عزلات الفطر المضاد على أزهار بخور مريم والجيرانيوم ، تبين أن للعائل الدور الأساسى فى المقاومة الحيوية وليس لعزلة الكائن المضاد ، على درجات الحرارة المنخفضة .

### ٤ - الرطوبة الحرة :

العلاقة بين الرطوبة الجوية ، الندى ، المطر ، الرى أو أى أشكال أخرى من توفر الرطوبة ، والمقاومة الحيوية للفطر *B. cinerea* فى المحاصيل المختلفة باستعمال الفطر المضاد *C. rosea* ، ليس لها تأثير كبير ، ولكن الدور الذى تقوم به ، يكون فى بقاء ، إنبات ونمو الفطر المضاد على سطوح النبات وفى عملية اختراق الفطر لسطح النبات . تفشل الجراثيم الكونيدية للفطر *C. rosea* فى الإنبات على المجموع الخضرى الجاف فى بادرات البيسيه السوداء فى مرقاد الإنبات على ١٢ ، ٢٠ و ٢٨ م . كانت تحدد مقدرتها على الإنبات عن طريق إعادة عزل الفطر من بيئة PDA ، فكانت تنخفض بشدة مع تقدم الزمن بعد إضافتها على البذور فى البيسيه السوداء ومن المحتمل على عوائل أخرى . إن فترة الرطوبة ضرورية خلال الساعات الأولى من استعمال الفطر المضاد للحصول على أفضل نمو وأفضل مقاومة حيوية . أما فى الدراسات الحقلية ، تبين أن فترة الأمطار القصيرة (مساء كانت صناعية أو طبيعية) بعد استعمال الفطر المضاد على نباتات الفراولة ، تستنزف كثافة اللقاح للكائن المضاد على الأوراق وتخفض كفاءة المقاومة الحيوية . بالإضافة للتأثيرات على الفطر المضاد ، هناك تأثيرات أيضاً على الكائن الممرض وعلى النبات العائل أيضاً ، بالتالى تؤثر على كفاءة المقاومة الحيوية .

من ذلك يتبين أن الرطوبة العادية ، ضرورية لنجاح المقاومة الحيوية بالفطر المضاد المذكور سابقاً ، ولكن الرطوبة الغزيرة من الأمطار تخفض نسبة نجاح المقاومة الحيوية ؛ لذا يجب مراعاة هذه النقطة عند رى النباتات ، بحيث لا تصل قطرات الماء إلى أماكن استعمال (تواجد) الجراثيم الكونيدية للفطر المضاد .

### علاقة الفطر *C. rosea* مع أنسجة العائل :

تكون الجراثيم الكونيدية للفطر *C. rosea* قادرة على الإنبات فى توفر الرطوبة على سطح العائل وتنتج أنبوبة إنبات بسيطة ، وهيفا سطحية وتخرق الأوراق ، السيقان ، البتلات والأسدية لأنواع مختلفة من النباتات . التكشف السطحي للكائن المضاد يمكن ملاحظته تماماً عند إجراء الدراسة تحت ظروف مستمرة من الرطوبة العالية وحرارة ٢١-٢٣ م° على أوراق وساق وأسدية نبات الفراولة . هناك نسبة عالية (٧٠-٩٠ ٪) من الجراثيم الكونيدية تنبت بعد ٤-١٢ ساعة من الحقن ، وتنتج أنبوبة إنبات ضيقة (١ - ١,٥ ميكرومتر) والتي تستطيل بسرعة بعد ١٢-١٦ ساعة على الأسدية والسيقان ، بالترتيب وبيضاء بعد ١٢-٢٤ ساعة على الأوراق ، تتكشف تفرعات قصيرة (١-٥ ميكرومتر) على أنابيب الإنبات ، وهيفات بعد ١٦ ساعة ، وتخرق أنسجة العائل مباشرة . من الملاحظ أن الحوامل الكونيدية العنقودية (خصلية) والسوارية للفطر المضاد *C. rosea* تتكشف من هيفات سميكة سطحية على السيقان ، الأسدية والأوراق بعد ٣٢-٧٢ ساعة ، وتنتج أعداداً كبيرة من الجراثيم الكونيدية بعد ٤٠-٧٢ ساعة . وبالتالي فإن الكائن المضاد ، لديه كفاءة لأن يتكاثر فى الطور الـ epiphytic فى موقعه ، وهذا ما يعرف بأنه طور ممتاز لعامل المقاومة الحيوية المستعمل على المجموع الخضرى والأزهار ، وبالتالي يمكن أن يشارك فى مؤازرة مقاومة الفطر الممرض *B. cinerea* فى المحصول .

يكون تكشف الفطر *C. rosea* بعد اختراقه المجموع الخضرى فى النبات والأزهار ، بشكل عام غير واضح ، سواء بقى محدداً ومقتصرأ فى مكانه أو استعمر مساحات كبيرة من أنسجة العائل ، وهذا يمكن أن يعتمد على وظيفة ، نوع ، عمر والحالة الفسيولوجية لأنسجة العائل . الدلائل التفصيلية ، مبنية على إعادة عزل الفطر المضاد من النسيج على مسافات مختلفة من منطقة الحقن . دلت الدراسة على أن الكائن المضاد يبقى فى موضعه (محلياً) على الأقل لمدة ثلاثة شهور فى سيقان نباتات الطماطم النامية بقوة ، إلا أنه يستعمر

بشدة الأوراق في سن الشيخوخة وكذلك أزهار الفراولة ، البيجونيا ، بخور مريم ، والجيرانيوم وغالباً ما يتجرثم خلال يومين بعد موت الأنسجة . تشجع الأنسجة في طور الشيخوخة بشكل واضح ، الكائن المضاد ، بأن يستعمرها ، إلا أنه أيضاً يستعمر العناصر الوعائية في نباتات فول الصويا النامية بقوة ونباتات البرسيم الأحمر . لقد دلت جميع التجارب على أن أنسجة النبات العائل التي تحقن بالفطر المضاد تبقى خالية من أية أعراض متسببة عنه ، إلا أنه في حالات نادرة ، عند استعمال لقاح مكثف من الميسيليوم تظهر بقع على السويقة الجينية السفلى في الفاصوليا .

### طرق عمل الفطر *C. rosea*

يعتمد هذا الفطر في عمله في المقاومة الحيوية ضد الفطر الممرض *B. cinerea* على المنافسة على المواد الغذائية وعلى عملية التطفل الفطري Mycoparasitism . تكون المنافسة الغذائية مهمة على المجال الورقى في معظم نباتات الزينة . يبدو بشكل واضح أن الكائن المضاد يستعمر ويستغل الأنسجة المتقدمة في السن بسرعة أكبر مما يعمله الكائن الممرض *B. cinerea* ، وكذلك فإنه يعوق استعمار الأنسجة الحديثة من قبل الكائن الممرض . هذه الطريقة من العمل أساسية ، بسبب أنها تشارك في تثبيط اللقاح للفطر الممرض . ونظراً لأن الكائن المضاد متطفل فطري على كل من الهيفات ، الجراثيم ، الأجسام الحجرية والأجسام الثمرية لكثير من الفطريات الممرضة من ضمنها *B. cinerea* إلا أن Sutton et al سنة ١٩٩٧ أثبت أن هذه العمليات لا تتم كلها معاً في الحقل لا على الأوراق في نبات العليق .

ومن الجدير بالذكر أن بعض الدراسات أثبتت أن التفاعلات بين *C. rosea* والفطر *B. cinerea* تكون ظاهرة بوضوح على أوراق ، أسدية ومياسم أزهار نبات العليق الموجودة تحت الرطوبة العالية المستمرة ، على الأوراق فإن الفطر المضاد يثبط بقوة إنبات ونمو أنبوية الإنبات للفطر *B. cinerea* ، ولكن نادراً ما يتطفل على الكائن الممرض . أما على السيقان ، فإن الجراثيم الكونيدية للفطر الممرض كثيراً ما تنمو وتنتج أنابيب إنبات جيدة التكوين وهيفات سطحية بغض النظر عن قربها من الجراثيم الكونيدية ، أنابيب الإنبات أو هيفات الفطر المضاد . يكون التضاد واضحاً على السيقان على شكل تثبيط معتدل لنمو أنبوية الإنبات ، وتطفل قوى على الفطر الممرض بواسطة الفطر المضاد . خلال توفر الرطوبة العالية

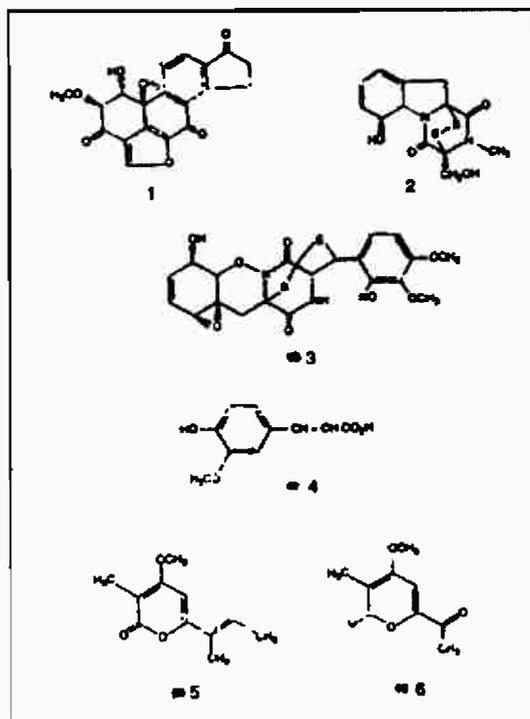
(٢٢-٧٢ ساعة) فإن تفرعات هيفية قصيرة من الفطر المضاد تتصل مع ، تنمو على أو تلتف حول (وفى كثير من الحالات تخترق الجراثيم الكونيدية) هيفات الفطر *B. cinerea* ، عادة فإن الخلايا المهاجمة تفقد محتوياتها ، وتنهار بعض الهيفات ، سواء كانت أم لم تكن خلايا الفطر الممرض حية عند اختراقها . الهيفات النامية داخلياً أو خارجياً أو السطحية أو التي بين الخلايا ، تدل على أن كثيراً من الهيفات تكون متداخلة مع بعضها البعض من كل من الفطرين ، الممرض والمضاد وذلك عند مقارنة النمو المتكرر الرقيق للهيفا فى الكائن الممرض المتكشفة ضمن الخلايا المتحطمة من الثقوب التي فى الحواجز للخلايا غير المتحطمة المتجاورة . وبشكل عام فإنه على سطوح الأسدية ، فإن الفطر المضاد لا يبسط إنبات ، نمو أو انتاج أعضاء الالتصاق *appressoria* ووسادة العدوى للفطر الممرض ، ولم يلاحظ أنها تتطفل على الكائن الممرض . وعلى أية حال فإن الكائن المضاد يخفف كثيراً من حدوث الاستعمار فى الأسدية بواسطة الكائن الممرض . لقد اعتمد على الاختلافات فى توافر وتركيب المواد الغذائية والمواد المضادة الفطرية فى الإفرازات على سطح العائل ، قد اعتمد عليها ، كمنظرة لتوضيح الاختلافات غير العادية فى تفاعلات الكائن المضاد مع الكائن الممرض على الأنسجة المختلفة لنبات العليق .

بالإضافة إلى التنافس والتطفل الفطرى ، فمن المحتمل أن الفطر المضاد ، يضاد الفطر الممرض عن طريق التضاد الحيوى . ينتج الكائن المضاد مجموعة من المثبطات الفطرية وإزيمات محللة للجدار ، بعضها يستطيع أن يعمل فى سيناريو متشابك من التضاد الحيوى والتطفل الفطرى . كذلك فإن ظاهرة فقد الانتفاخ ، وتحلل هيفات الفطر الممرض كل منها تستحث بواسطة الفطر المضاد ، ويمكن أن تعتبر داخلة فى كلتا الطريقتين الداخلتين فى التضاد . وبشكل عام فإن التضاد الحيوى يظهر بأنه يعمل فقط فوق مساحة صغيرة ، هذا يعنى أن الكائن المضاد يجب أن يكون له طريق للوصول إلى المغذيات القريبة من الكائن الممرض ، وأن هذا التنافس الغذائى يجب أن يكون داعماً للتضاد الحيوى . بينما الفطر *C. rosea* عنده قدرة لينتج على الأقل مادة مضادة فطرية من نواتج الميتابولزم ، إلا أنه لا يوجد أى دليل على دخول هذه المضادات الحيوية فى هذه المقاومة . وما يؤيد ذلك أن الطفرات من الفطر المضاد ، التي تنتج مستويات عالية أو متوسطة من نواتج التمثيل أو لا تنتج أبداً ، لا تختلف فى كفاءتها فى المقاومة الحيوية ضد الفطر الممرض فى أوراق الفراولة . لا يوجد أى دليل واضح على أن الفطر *C. rosea* يحدث مقاومة مستحدثة فى نباتات العائل .

هناك أنواع أخرى من الفطر *Gliocladium* تنتج مضادات حيوية مختلفة لها دور في

المقاومة الحيوية (شكل ١١) هذه المضادات هي :

- ١ - Viridin يفرزه الفطر *Gliocladium virens* .
- ٢ - Gliotoxin يفرزه الفطر *G. deliquescens* .
- ٣ - Gliovirin يفرزه الفطر *G. deliquescens* .
- ٤ - Ferulic acid يفرزه الفطر السابق أيضاً .
- ٥ - Viridin + Gliotoxin + dehydrogliotoxin يفرزه الفطر *G. flavafuscum* .
- ٦ - Pyrones, nectriapyrone يفرزه الفطر *G. vermoesonii* .
- ٧ - Nectriapyrone + vermopyrone يفرزه الفطر السابق أيضاً .



شكل رقم (١١) : المضادات الحيوية التي تفرزها بعض أنواع الجنس *Gliocladium* .

- |                   |                      |                  |
|-------------------|----------------------|------------------|
| Gliovirin - ٣     | Gliotoxin - ٢        | viridin - ١      |
| nectriapyrone - ٦ | dehydrogliotoxin - ٥ | Ferulic acid - ٤ |

## طرق استعمال الكائن المضاد عملياً

حدث تقدم ملموس فى طرق تخضير اللقاح للكائن المضاد ، ووقت استعماله وكيفية استعماله ، وذلك للحصول على أعلى كفاءة فى المقاومة الحيوية باستعمال *C. rosea* ضد الفطر المرض *B. cinerea* على كثير من المحاصيل . يمكن الحصول على لقاح الفطر المضاد *C. rosea* بسهولة وقلة تكاليف ، وذلك بتسمية الفطر على حبوب القمح أو النجيليات الأخرى . فى بعض المعامل يمكن الحصول على تركيزات عالية من الكائن المضاد ( ١ - ١٠ × ٥ جراثيم كونيديا/غم ) خلال ٣٥ يوماً على حبوب القمح المحفوظة على ٢٠ - ٢٣ م° . بعد فترة النمو الابتدائى للميسيليوم الأولى (١٤-١٨ يوماً) تترك المزارع لتجف ببطء . هذه العملية تشجع إنتاج الحوامل الكونيدية التى هى على شكل خصل والتي تنتج محصولاً وفيراً من الجراثيم الكونيدية أكثر من إنتاج الحوامل الكونيدية ذات الشكل السوارى ، حيث أن الحوامل الكونيدية السوارية تتكون عادة تحت ظروف الرطوبة العالية . بالإضافة إلى الجراثيم الكونيدية فإن أجزاء الميسيليوم من الفطر *C. rosea* يمكن عزلها من حبوب القمح بعد ١٥ يوماً ، حيث وجد أنها فعالة ضد الفطر المرض *B. cinerea* فى الفراولة . الكونيدات المأخوذة من حبوب القمح يمكن تخزينها لمدة أكثر من سنة على حرارة ٣ - ٥ م° ، ولد ٣ شهور على حرارة ٢٠ - ٢٣ م° دون أى فقد معنوى فى حيوية أو كفاءة المقاومة الحيوية التى تحدثها ، هذه المعلومات مهمة فى الانتاج التجارى للكائن المضاد . قبل استعمال الكائن المضاد على المحاصيل ، فإن الجراثيم الكونيدية لهذا الفطر يمكن أن تعلق فى ماء مضافاً إليه مطهر سطحى مثل *Triton x - 100* أو أنها تتشكل على شكل مسحوق مع بودرة التلك أو أى حامل آخر .

إن أفضل طريقة لاستعمال الفطر *C. rosea* تعتمد على نوع نسيج العائل الذى يتطلب الوقاية ، فمثلاً طريقة الرش ، تستعمل لإسقاط وترسيب القطيرات الصغيرة من اللقاح بانتظام على السطح المستهدف . هذه الطريقة مناسبة بشكل عام فى معاملة المجموع الخضرى والأزهار فى كثير من المحاصيل . هناك طرق أخرى أكثر تخصصاً وحدائة تكتشف باستمرار للاستعمال على الأنسجة المستهدفة الخاصة . بالنسبة للجروح التى تحدث على

عقل الجيرانيوم ، تعامل بسهولة عن طريق الغمر السريع للعقل في اللقاح ، بينما الجروح الناتجة عن إزالة الأوراق في الظماطم والخيار في الصوبات الزجاجية ، يمكن أن تعامل باستعمال الرشاشة اليدوية أو الفرشاة أو قطعة قماش ماسحة . الأدوات التي تستعمل باستمرار لإزالة الأوراق السفلية ، يمكن أن تستعمل لرش اللقاح على الجروح وتشارك في فعالية هذه الطريقة . أزهار الفراولة والعليق يتم معاملتها بنجاح بالفطر المضاد *C. rosea* باستعمال النحل كعامل لنقل اللقاح .

III : الجنس *Cladorrhinum*

## مقدمة

الأبحاث الحديثة على المقاومة الحيوية للكائنات الممرضة النباتية الكامنة في التربة ، تجرى باستمرار وتتسارع مضطرد . يعود هذا التسارع جزئياً ، إلى زيادة المعرفة في إنتاج ، تشكيل وإعطاء أو استعمال عوامل مقاومة حيوية مختلفة والتي تشمل فطريات ، بكتيريا واكتينومايستس . هناك سبعة أجناس فطرية مشهورة في المقاومة الحيوية مذكورة في الفصل الأول من الكتاب ، ويمكن أن يضاف إليها الجنس *Cladorrhinum* .

لعدة سنوات مضت ، لاحظ العلماء في معمل أمراض النبات ، قسم المقاومة الحيوية في Beltsville في أمريكا سنة ١٩٩٥ ، أن هناك فطراً لونه أبيض نشيط النمو ، ينمو على بيئة ماء + آجار + مضادات حيوية مأخوذة من بذور البنجر الموضوعه لمدة ثلاثة أسابيع في تربة مختلفة ملوثة بالفطر *R. solani* . عند وضع بذور البنجر في تربة ملوثة بالفطر *R. solani* (هذا عمل روتيني لاختبار كثافة اللقاح للكائن الممرض في التربة) ثم أخذها ووضعها على بيئة آجار في المعمل ، فإن هذا الفطر الأبيض ينمو من بذور البنجر على الآجار خلال ٢٤ ساعة ويحل محل الفطر *R. solani* في بذور البنجر ويمنع النمو الترمي للكائن الممرض في التربة . عند إرسال عينات من هذا الفطر إلى معهد الدراسات البيولوجية (CBS) تحت رئاسة الدكتور *W. Gams* في هولندا ، صنف هذا الفطر على أساس أنه *Cladorrhinum foecundissimum* Sacc & Marchal .

تنمو مستعمرات هذا الفطر ، تنتشر بالعرض وتكون ذات خصل شعرية ولها ميسيليوم هوائى وتكون ذات لون رمادى إلى أرجوانى مصفرة ذهبية ، والتي أحياناً تشكل عناقيد من الهيفات الخضرية الشفافة . الجراثيم الكونيدية غير واضحة ، وتأخذ الشكل الإصبعى أو الكروى ، وذات حجم  $(3-3,5) \times (2,5-3)$  ميكرومتر . يمكن أن يعزل الفطر من التربة أو من Buckwheat ، وقد وصف الفطر بأنه من ساكنات التربة ، إلا أنه من الصعوبة عزله من التربة نظراً لصعوبة إنبات الجراثيم الكونيدية على البيئات الغذائية المتوفرة .

لقد تبين أن لهذا الفطر نشاطاً في أفرار المضادات الحيوية ضد كل من *R. solani* والفطر *Pythium ultimum* . هناك أنواعاً أخرى من الفطر منها *C. brunnescens* ، تثبط بشكل معنوي فطريات العفن الأبيض مثل *Trametes versicolor* و *Stereum rugosum* ، ولقد تبين أن هذا الجنس يحلل السليلوز والبكتين والزيولين .

### تأثير الفطر *Cladorrhinum* على نمو الفطر رايزوكتونيا

لقد درس الفطر *C. foecundissimum* النامي على تخضيرات من النخالة ، ودرست كفاءته في المقاومة الحيوية ضد الفطر الكامن في التربة *R. solani* ، في التربة وفي المزارع بدون تربة ، ودرست مقدرته على خفض حدوث مرض سقوط البادرات في بنجر السكر ، الباذنجان والفلفل ، المتسبب عن الفطر *R. solani* ودرست مدى كفاءته على الاستعمال في المقاومة الحيوية .

وجد أن اللقاح المكون من النخالة ، للعزلة *CF-1* من الفطر *C. foecundissimum* المحضنة لمدة ١٧ يوماً ، لا تخفض مدة البقاء الحي للكائن المرض *R. solani* على بذور بنجر السكر الملوثة بالفطر *R. solani* والمزروعة في تربة لومية رملية (*LS*) أو لومية رملية طينية (*SCL*) . لكن اللقاح المحضن نفسه لمدة ٢٣ يوماً ، منع نمو الكائن المرض من الانتقال من بذور البنجر إلى التربة . كذلك قد تم إيقاف النمو الترمي للفطر *R. solani* المضاف كمخلوط مع مجروش الذرة على المزارع بدون تربة *soilless* ، أيضاً قد تم إيقافه بواسطة العزلة *CF-1* في أربعة أنواع من الأراضي . كذلك هناك أربع عزلات أخرى من الفطر المضاد ، وهي : *CF-1* - 62373, *AT CC* - 181-66, *CBS-* 182-66, *CBS-* كلها تمنع النمو التطفلي للفطر *R. solani* في أراضي *LS* عندما يكون لقاح الكائن المرض موجوداً في مخلوط *Soilless* ومزوداً بمجروش الذرة . الأفراد ذات العمر ٣٣ يوماً من السلالة *CF-1* والسلالة *ATCC-62375* منعت سقوط البادرات في بنجر السكر المتسبب عن الفطر *R. solani* في أراضي *SL* بعد أربعة أسابيع من النمو . أما استعمال السلالة *CF-1* فإنه أدى إلى زيادة أعداد النباتات السليمة أكبر من ٩٠ ٪ أعلى من تلك المزروعة في الكنترول . وعلى النقيض من ذلك فإن استعمال العزلات *CBS - 181 - 66* و *CBS - 182 - 66* أدى إلى زيادة أعداد النباتات السليمة بنسبة أقل من تلك المزروعة في

تربة ملوثة بالكائن المرض . العزلات المحضرة والمخلوطة مع النخالة مثل CF-1 و ATCC-62373 منعت سقوط البادرات في الباذنجان والفلفل في مخلوط بدون تربة soilless ، واعتماداً على معدل اللقاح المستعمل ، يؤدي ذلك إلى زيادة النباتات السليمة بالمقارنة مع تلك المزروعة في مخلوط دون تربة ، خالياً من الكائن المرض (جدول ٨١ ، ٨٢ ، ٨٣) .

جدول رقم ٨١ : البقاء والنمو الترمي للفطر *R.solani* العزلة (R-23) في تربة LS و SCL مع تحضيرات الفطر المضاد على النخالة بأعمار مختلفة من السلالة CF-1 .

| نوع التربة            | عمر اللقاح<br>بالأيام | بقاء الفطر المرض<br>في بذور بنجر ملوثة<br>(دليل الاستعمار) | النمو الترمي للفطر<br>المرض من بذور<br>بنجر ملوثة في التربة<br>(دليل الاستعمار) |
|-----------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| لومية رملية (LS)      | الفطر المرض لوحده     | ٤,٤                                                        | ٣,٦                                                                             |
|                       | نخاله فقط             | ٤,٣                                                        | ٣,٢                                                                             |
|                       | صفر                   | ٤,٢                                                        | ٣,٥                                                                             |
|                       | ٣                     | ٤,٣                                                        | ٢,٣                                                                             |
|                       | ٦                     | ٣,٨                                                        | ٠,٦                                                                             |
|                       | ١٠                    | ٤,٤                                                        | ٠,٤                                                                             |
|                       | ١٧                    | ٣,٨                                                        | ٠,١                                                                             |
| لومية رملية طينية SCL | الفطر المرض لوحده     | ٤,٣                                                        | ٤,١                                                                             |
|                       | نخالة واحدة           | ٤,١                                                        | ٤,٠                                                                             |
|                       | صفر                   | ٣,٧                                                        | ٤,٠                                                                             |
|                       | ٣                     | ٣,٦                                                        | ٢,٦                                                                             |
|                       | ٦                     | ٤,٣                                                        | ١,٤                                                                             |
|                       | ١٠                    | ٤,٤                                                        | ٠,٨                                                                             |
|                       | ١٧                    | ٤,٦                                                        | ٠,٨                                                                             |

ملاحظات على الجدول :

كان التقدير يتم بعد ثلاثة أيام من إضافة تخضيرات النخالة ( ١ % وزن/وزن) إلى تربة ملوثة بالفطر *R.solani* . دليل الاستعمار : يسدل على نمو الفطر الممرض على سطح آجار محيط ببذرة بنجر السكر حيث أن :

صفر = لا يوجد نمو . ١ = نمو على شكل خيوط قليلة .

٢، ٣، ٤، ٥ = ٢٥، ٥٠، ٧٥، ١٠٠ % من السطح المحيط بالبذرة مغطى بالهيفات ، بالترتيب

جدول رقم ٨٢ : النمو التطفلي للفطر الممرض *R. solani* العزلة (*R-23*) من لقاح مجروش الدرة المخلوط مع مواد غير عضوية في تربة لومية رملية مضافاً إليها تخضيرات الفطر المضاد *C.foecundissimum* النامي على النخالة ، والمكون من أربعة عزلات .

| العزلة                          | النمو التطفلي للفطر الممرض دليل الاستعمار |
|---------------------------------|-------------------------------------------|
| <i>R. solani</i> لوحدة (كنترول) | ٣,٨                                       |
| نخالة خالية من الكائن المضاد    | ٣,٢                                       |
| السلالة CF-1                    | ٠,١                                       |
| السلالة ATCC-62373              | ٠,١                                       |
| السلالة CBS-182-66              | ١,٥                                       |
| السلالة CBS-181-66              | ١,٦                                       |

ملاحظات على الجدول :

كان يتم التقدير بعد ٣ أسابيع من إضافة تخضيرات النخالة ١ % وزن/وزن إلى التربة الملوثة بالكائن الممرض . دليل الاستعمار كما في الجدول السابق .

جدول رقم ٨٣ : النباتات السليمة من الباذنجان والقلقل المزروعة في مخلوط (بدون تربة زراعية) ، ملوثة بالفطر الممرض *R. solani* العزلة (R-23) المعاملة بمعدلات عديدة من تحضيرات ذات عمر ١٠ أيام من العزلات المختلفة من الفطر المضاد بعد ٢ و ٤ أسابيع من النمو .

| % نباتات سليمة<br>من القلقل بعد |        | % نباتات سليمة<br>من الباذنجان بعد |        | معدل اللقاح<br>% وزن / وزن | العزلة                        |
|---------------------------------|--------|------------------------------------|--------|----------------------------|-------------------------------|
| ٢٨ يوم                          | ١٤ يوم | ٢٨ يوم                             | ١٤ يوم |                            |                               |
| ٨٩                              | ٩٢     | ٨٩                                 | ٩٥     | صفر                        | كنترول (بدون كائن ممرض)       |
| ١٧                              | ٤٢     | ١٠                                 | ٥٧     | صفر                        | كنترول (كائن ممرض فقط)        |
| ٠٧                              | ٢٩     | ٧                                  | ٤٣     | صفر                        | كنترول (نخالة بدون كائن مضاد) |
| ٢٠                              | ٦٩     | ٨٥                                 | ٩٠     | ٠,٣                        | CF-1                          |
| ٢١                              | ٧٣     | ٧٣                                 | ٨٧     | ٠,٧                        | CF-1                          |
| ٨٩                              | ٩٢     | ---                                | ---    | ١,٣                        | CF-1                          |
| ٦٩                              | ٩٢     | ---                                | ---    | ٢,٦                        | CF-1                          |
| ١٨                              | ٤٧     | ٧٩                                 | ٩٤     | ٠,٣                        | ATCC-62373                    |
| ١٨                              | ٤٩     | ٥٧                                 | ٨٣     | ٠,٧                        | ATCC-62373                    |
| ٥٦                              | ٨٣     | ---                                | ---    | ١,٣                        | ATCC-62373                    |
| ٦٩                              | ٨٧     | ---                                | ---    | ٢,٦                        | ATCC-62373                    |

ملاحظات على الجدول :

عوملت بادرات الباذنجان بالسلالة CF-1 والسلالة ATCC-62373 بمعدل ١,٣ و ٢,٦ % ، ولكنها لم تحدد تحضيرات النخالة الخالية من الكائن المضاد الذي أضيف إلى الكائن الممرض (زراعة بدون تربة ملوثة بالفطر) بمعدل ٠,٧ % وزن/وزن بالنسبة لتجارب الباذنجان و ٢,٦ % وزن/وزن لتجارب القلقل .

## IV : الجنس Talaromyces

### دور الجنس في المقاومة الحيوية

يعتبر الفطر *T.flavus* من الفطريات الإسكية ساكنات التربة ، الطور اللاجنسى له يسمى *Penicillium dangeardii* وله اسم مرادف هو *P.vermiculatum* ، يستعمل هذا الفطر في المقاومة الحيوية لبعض أمراض النبات ، فهو يثبط ذبول الفير تسليم في الطماطم ، الباذنجان والبطاطس ، ويتطفل على كل من *Sclerotium sclerotinia*, *R.solani*, *Sclerotium rolfisii* وبشكل عام فإن الميكانيكية المستعملة من قبل هذا الكائن المضاد في المقاومة الحيوية ضد الفطريات الممرضة النباتية ، تشمل التطفل الفطري *Mycoparasitism* ، التضاد الحيوى ، التنافس والمقاومة المستحثة .

يستعمل هذا الفطر الأنزيمات المحللة لجدار الخلية ، مثل  $\beta$ - 1,3 - Chitinase, glucanase, cellulase في التضاد الحيوى . وجد أن الفطر *T. flavus* يضاد الفطر *verticillium dahliae* عن طريق التطفل والتضاد الحيوى ، ووجد أيضاً أن الأجسام الحجرية الدقيقة *Microsclerotia* للفطر الممرض *V.dahliae* ، يمكن أن تقتل براشع مزرعة الفطر المضاد *T.flavus* . هذه السمية التي يظهرها راشع المزرعة يمكن أن تعزى إلى فعل مادة *Glucose oxidase* . مع أن الفطر *T.flavus* ينتج عديداً من الإنزيمات المفترزة خارج الخلايا ، إلا أنه لغاية ١٩٩٧ لم يحدد أى من هذه الإنزيمات له الدور الأهم الذى يلعبه في المقاومة الحيوية .

استعملت في إحدى التجارب عشر سلالات عادية ، وطفرتان من السلالات المقاومة للمبيد الفطرى بينومايل ، من الفطر *T.flavus* ، ودرست مقدرتها على إفراز الإنزيمات المحطمة للجدار الخلقى ، وهى  $\beta$ -1,3 - glucanase و Chitinase و Cellulase ودورها في التطفل على الأجسام الحجرية للفطر *S.rolfsii* ، وذلك لخفض الإصابة بمرض عفن ساق الفاصوليا ، ومقدرتها على إفراز مواد مضادة فطرية توقف نشاط الفطر الممرض *V.dahliae* .

تبين أن الطفرة المقاومة للبينومايل Ben TFI-R6 تفرز كميات كبيرة من الإنزيمات خارج الخلية ، وتزيد نشاط التثبيط ضد الفطر *S.rolfsii* و *V.dahliae* بالمقارنة مع السلالات العادية والطفرات الأخرى . ولقد تبين أن ظاهرة التطفل الفطرية بواسطة *T.flavus*

والمقاومة الحيوية به ضد الفطر الممرض *S.rolfsii* ، تتعلق بنشاطه لإفراز إنزيم Chitinase . ومن ناحية أخرى فإن نشاط *T.flavus* فى المقاومة الحيوية للفطر *V.dahliae* يعتمد على نشاط مركبات التضاد الفطري مثل Glucose - oxidase حيث إن هذه المادة تعوق إنبات ونمو هيفات الفطر ، وتسبب اللون الأسود فى الأجسام الحجرية الدقيقة Microsclerotia المتكونة حديثاً . الجدول (رقم ٨٤) يبين كفاءة بعض السلالات فى إنتاج الإنزيمات المختلفة .

أما بالنسبة للمقاومة الحيوية لمرض عفن ساق الفاصوليا المتسبب عن الفطر *S.rolfsii* ، فتبين أن عزلات الفطر *T.flavus* قادرة على تخفيض المرض بنسبة ٦٤ ٪ ، وذلك عند معاملة الأجسام الحجرية بالجراثيم الكونيدية من السلالة المقاومة للمبيد بنليت TFI-R6 ، بينما لم تخفض السلالة TF-62 و TF-46 الإصابة بالمرض (جدول رقم ٨٤) . أما عن علاقة الإنزيمات وتثبيط المرض فهو واضح فى جدول (رقم ٨٥) . أما عن العزلات الأخرى فيتراوح خفضها للمرض من ٥-٥٢ ٪ .

تعتبر ظاهرة تطفل *T.flavus* على الأجسام الحجرية للفطر الممرض *S.rolfsii* ميكانيكية مهمة فى تثبيط هذا الفطر وخفض المرض (شكل ١٢) . وقد وجد أن السلالة TFI-R6 لها قدرة عالية على التطفل الفطري ، ووجد أنها تستعمر ٦٣ ٪ من الأجسام الحجرية للفطر الممرض ، بينما السلالات TF-62 و TF-46 لم تستعمر أى جسم حجرى . كانت تجارب الصويا الزجاجية تجرى كالآتى :

تحضر أوعية بلاستيكية قطر ١٠ سم ، وتملأ بحوالى ٣٥٠ غرام تربة رملية ، وينزع فى كل وعاء خمس بذور من الفاصوليا . كانت تحضر أجسام حجرية جافة للفطر *S.rolfsii* وتنقع فى المعلق الجرثومى للفطر المضاد *T.flavus* بتركيز ١٠<sup>٧</sup> جرثومة/مل ، ثم بعد ذلك يؤخذ جسم حجرى واحد ويوضع على بعد نصف سم من بذرة الفاصوليا ، ثم تغطى البذرة والجسم الحجرى بحوالى ١٥٠ غرام تربة رملية . تحفظ الأوعية فى الصويا الزجاجية على حرارة ٢٥-٣٠ م ، تقدر أعراض المرض (عفن الساق) كل يوم لمدة ثلاثة أسابيع بعد الإنبات .

جدول رقم ٨٤ : النشاط الإنزيمي ونشاط سلالات *T.flavus* ضد الفطرين *S.rolfsii* و *V.dahliae*

| V.dahliae | S.rolfsii           |                                      | نوع الإنزيم     |           |           |           | السلالة المستعملة |
|-----------|---------------------|--------------------------------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|-------------------|
|           | % تخفيض إصابة المرض | % تطفل على الأجسام الحجرية في التربة | Glucose oxidase | Cellulase | Glucanase | Chitinase |                   |
| ٥١٢       | ٦٤                  | ٦٣                                   | ٥٢٩             | ٥٥,١      | ١٧٢٤      | ١٥,١      | TFI-R6            |
| ١٢٨       | ٥٢                  | ٥٦                                   | ٢٨٠             | ٨,١       | ٨١٣       | ١٠,٠      | TF-64             |
| ٦٤        | ٤٣                  | ٤٤                                   | ١١٧             | ٢٥,٣      | ٩٧٠       | ٨,٩       | TF-17             |
| ٦٤        | ٣٢                  | ١٨                                   | ١٢٩             | ٢٧,٦      | ١٠١٠      | ٨,٩       | TF-1              |
| ١٢٨       | ٥                   | ٠٤                                   | ١٦٥             | ١٨,٢      | ٧١٠       | ٤,٢       | FFI-R3            |
| ٦٤        | صفر                 | صفر                                  | ١٣١             | ٥,٠       | ٩٥٢       | ٠,٩       | TF-62             |
| ٨         | صفر                 | صفر                                  | ٩٦              | ٦,٤       | ١١٠       | ٠,٦       | TF-46             |

ملاحظات على الجدول :

Chitinase = مكرومول من N-acetyl glucoseamine / ساعة/ملغم من البروتين.

Glucanase و Cellulase = مكرومول غلوكوز / ساعة / ملغم من البروتين .

Glucose oxidase = مكرومولز H2O2 / دقيقة / ملغم من البروتين .

نشاط التضاد الحيوي للفطر *V.dahliae* = أعلى تخفيف من راشح المزرعة الذي يثبط إنبات الأجسام

الحجرية الصغيرة للفطر كلية .

في دراسة فسيولوجية على الفطر *T.flavus* ، وجد أن أفضل نمو خضري وانتاج للهيئات الفطرية ، يحدث عند تنميتها على سكريات معقدة مثل عديدات التسكر (٣٢) غرام/لتر من البيئة) و *B.glucosides* (٢,٤) غرام لكل لتر من البيئة) . وكان أقل نمو للهيئات على السكريات الأحادية . أما انتاج الجراثيم الاسكية فيتم بعد ٦ أسابيع من النمو على بيئة صلبة وتحضينها على ٣٧ م . وجد أن أفضل مصدر غذائي هو السكريات القليلة التسكر oligosaccharides ؛ حيث تعطى ٢,٩ × ١٠<sup>٨</sup> جرثومة / ٥,٥ سم قطر بيئة في أطباق بترى ، أما Monosaccharides فتعطى ١,٦ أو ١,٤ × ١٠<sup>٨</sup> جرثومة / ٥,٥ سم



شكل رقم (١٢) : صورة بالميكروسكوب الإلكتروني تظهر تطفل الفطر *T. flavus* على الأجسام الحجرية للفطر *S. rolfsii* .

A : تحضين الأجسام الحجرية المحقونة ، في الظلام ، للحدث على الدورة الجنسية للفطر *T. flavus* وتكوين الأجسام الثمرية (CI) .

B : تحضين الأجسام الحجرية المحقونة تحت الإضاءة المستمرة يؤدي إلى النموات المخضرية ، وتكوين بنسليا عديدة (Pc) .

C + D : يلاحظ أن الأجسام الحجرية للفطر *S. rolfsii* تستعمر جزئياً بالفطر *T. flavus* ، وتظهر هيفات *S. rolfsii* (Sr) مهاجمة من قبل الفطر المضاد Tf وتلف هيفات Tf حول هيفات Sr كما في (C + D) .

D + E : على طول هيفات *T. flavus* فإن معظم مناطق التلامس مع *S. rolfsii* تتفخ وتظهر مفصلية . كذلك أنبوية الاختراق تظهر أيضاً منتفخة مثل تركيب عضو الالتصاق (Ap) .

F + G : يلاحظ هيفاً *T. flavus* تخترق الجدر الخلوية السميكة (CW) في الأجسام الحجرية للفطر *S. rolfsii* متبرعاً بتحطيم عضيات خلية العائل واختفاء محتويات السيتوبلازم .

مقياس الرسم = ١ ميكرومتر .

فطر فى البيئة فى أطباق بتري . بالنسبة لمصدر الكربون ، ليست هناك علاقة بين تكوين الجراثيم الإسكية والوزن الجاف للهيئا . أما المصادر المختلفة للنيتروجين فتعطى من صفر إلى ٩١٠ جرثومة إسكية لكل ٥,٥ قطر بيئة فى طبق بتري و ١٠<sup>-٤</sup> - ١٠<sup>-٥</sup> غرام من الهيفات الجافة لكل مل . وبشكل عام فإن مصدر النيتروجين ، الذى يؤدى لأفضل إنتاج من الجراثيم الإسكية يعطى أيضاً أفضل إنتاج من الهيفات الجافة . ولقد وجد أن عدد الجراثيم الإسكية يزيد كلما زادت نسبة C/N من ٥ : ١ إلى ٣٠ : ١ ، هذا التأثير يكون أكثر وضوحاً كلما كان C:N يزداد من ٥ : ١ إلى ١٥ : ١ . فى النسبة المنخفضة من C:N أقل من ١٥ : ١ فإن المعاملة بمادة hypoxanthine كمصدر للنيتروجين يؤدى إلى زيادة معنوية فى نمو ووزن الهيفات منه فى حالة المعاملة بترترات الأمونيوم . لا يوجد فرق معنوى عندما يكون C:N مساوياً أو أكبر من ١٥ : ١ .

كان حدوث مرض ذبول الفيرتسليم أقل بنسبة ٥٠ ٪ على نباتات الباذنجان المعاملة تربتها بالجراثيم الاسكية الناجمة من مزرعة نامية على بيئة PDA بالمقارنة مع نباتات الباذنجان المعاملة تربته بالجراثيم الاسكية الناجمة من مزرعة نامية على بيئة بها hypoxanthine + لاكتوز أو مالتوز . وبالتالي فإن مصادر الكربون والنيتروجين التى تزيد قليلاً انتاج الجراثيم الاسكية للفطر *T.flavus* تخفض كفاءة المقاومة الحيوية لذبول الفيرتسليم بالمقارنة مع الجراثيم الاسكية الناجمة من بيئة PDA (جدولان رقم ٨٥ ، ٨٦) .

جدول رقم (٨٥) : العلاقة بين النشاط الإنزيمى فى راضح مزرعة سلالات الفطر *T.flavus* ، ومقدرتها على التطفل على الأجسام الحجرية للفطر *S.rolfsii* لخفض مرض عفن ساق الفاصوليا فى تجارب الصوبا الزجاجية .

| Correlation | Coefficient   | الإنزيم         |
|-------------|---------------|-----------------|
| خفض المرض   | التطفل الفطرى |                 |
| ٠,٩٥٢       | ٠,٨٩٥         | Chitinase       |
| ٠,٣٢٣       | ٠,٢٨٣         | Glucanase       |
| ٠,٣٨٧       | ٠,٥٤٦         | Cellulase       |
| ٠,٤٢٦       | ٠,٥٤٤         | Glucose oxidase |

ملاحظات على الجدول :

Correlation و Coefficient معتمدة على جدول (رقم ٨٤) .

الأرقام معنوية من صفر على  $P = 0.05$  .

جدول رقم (٨٦) : العلاقة بين المقدرة على التطفل على الأجسام الحجرية للفطر *S.rolfsii* ، والخفض في شدة مرض عفن ساق الفاصوليا .

| % خفض المرض | % تطفل على الأجسام الحجرية |
|-------------|----------------------------|
| ١٨          | ٥                          |
| ٢٠          | ٦                          |
| ٣٠          | ١٠                         |
| ٤٠          | ١٨                         |
| ٣٨          | ٣٠                         |
| ٤٥          | ٤٥                         |
| ٥٨          | ٥٥                         |
| ٧٠          | ٧٠                         |

## V : الجنس *Aspergillus niger* An 27

### مقدمة

في الأبحاث التي قام بها Sharma & Sen سنة ١٩٩١ في الهند على نباتات العائلة القرعية التي تصاب بفيوزاريوم الذبول ، وجد أن بعض أنواع الجينوتايب تنجو من الإصابة بالمرض بالرغم من وجود الكائن الممرض بكثرة ، وعند فحص الرايزوسفير لهذه النباتات وجد أنها غنية جداً بالفطر *Aspergillus niger* . وجد عند دراسة هذا الجنس أن العزلة التي تصاحب النباتات الناجية من المرض هي AN 27 .

عند دراسة هذه العزلة معملياً ، وجد أن لها دوراً كبيراً في تثبيط نمو العزلة الفطرية الممرضة من الجنس فيوزاريوم ، مثل *Fusarium oxysporum meloins* و *F. solani* ووجد أيضاً أن العزلة AN 27 يمكن أن تقتل عديد من الـ *formae speciales* لكل من الفطريات الآتية :

- 1 - *Fusarium oxysporum*. 2 - *F. udum*. 3 - *Macrophomina phaseolina*  
4 - *Pythium sp.* 5 - *Rhizoctonia solani*. 6 - *Sclerotinia sclerotiorum*

وجد كذلك أيضاً أن العزلة *A.niger* An 27 لا تسمح بتكوين تركيبات ساكنة في أي من الفطريات السابقة . كما لوحظ نوعين من التفاعلات في المزارع البيئية بين هذه العزلة والعزلات الممرضة الأخرى . التفاعل الأول : يسبب منطقة تثبيط *Inhibition zones* ويسبب تحلل في خلايا بعض السلالات الممرضة أو ينمو ويتجرثم فوق نموات الكائن الممرض مع أو بدون مقاومة أولية . التفاعل الثاني : يثبط إنبات الجراثيم ويسبب اضطراب وتحلل في الجراثيم الكلاميدية والأجسام الحجرية ، ولكنه لا يثبط نمو الفطر *S. rolfsii* ، إلا أن هناك أبحاثاً أكدت تأثر هذا الفطر بالعزلة المضادة *A.niger* AN 27 .

### صفات الفطر *Aspergillus niger* AN 27

كما هو معروف فإن الجنس *Aspergillus sp.* ينتج أنواعاً مختلفة من المركبات الفعالة، تشمل عوامل مضادات فطرية ومضادات حيوية ، هذا ما وجدته Fujimoto *et al* سنة ١٩٩٣ . عند دراسة هذه العوامل المضادة الفطرية والبكتيرية بطرق التحليل الحديثة ، وجد أنها تحتوي على المركب -2- methoxy -6- acetoxo -3- trans and cis 4

hydroxyphenyl -2- methoxy butanolide . وجد أن الحد الأدنى من تركيز هذا المركب المثبط للفطر *F. oxysporum melonis* (يثبط نمو الميسيليوم) هو عشرة جزء في المليون ، ويمنع النمو تماماً على تركيز ١٥٠ جزء في المليون . لقد وجد في دراسة مقارنة على الفطر *Trichoderma harzianum* ، أن هذا الفطر يمتلك مضادات فطرية هي butanolide و harzianolide . إن وجود حلقة الـ butanolide في المركب الذى ينتج بواسطة السلالة AN 27 ، يؤيد طبيعة التضاد الفطرى لهذا المركب . عند استعمال الصبغات المتطايرة والميكروسكوب الفلوروسنتى فى دراسة منطقة التثبيط فى البيئة الغذائية ، تبين أن الفطر AN 27 فقط هو المتواجد فى منطقة التثبيط ، بينما هيفات كل من *Pythium* و *Macrophomina phaseolina* ، *F.oxysporum* ، *F.ciceris* ، *aphanidermatum* و *R.solani* ، حصل لها تجويف وموت بدون احتراق . عند استعمال الميكروسكوب الالكترونى ، لوحظ أن الفطر AN 27 يلتف ويتجرثم حول الكائن الممرض . أخيراً فإن الهيفا الميتة من هذه الكائنات الممرضة تخرق . وقد تبين فسى دراسات لاحقة أن الفطر AN 27 يتصل ويستمر فى غزوه للأجزاء الميتة .

أثبتت الدراسات المتخصصة أن الفطر AN 27 ، ينتج كلاً من مجموعتى هيدروكساميت وكاتيكوليت للسايدروفورز (هذا ما أثبتته Mondal & Sen سنة ١٩٩٩) . كما هو معروف عن دور السايدروفورز فى كفاءته فى التضاد والمنافسة فى الرايزوسفير وتشجيع النمو النباتى ، هذه الأمور الثلاثة متوفرة فى الفطر موضوع الدراسة AN 27 . وبالتالي يمكن الافتراض بأن انتاج السايدروفورز بواسطة هذه السلالة الفطرية له دور كبير فى ظاهرة التضاد .

الفطر *Aspergillus niger* من الفطريات الموجودة دائماً ، ويفضل التواجد فى التربة (غازيات التربة) . يوجد فى التربة على عمق ٤٥ سم ويتحمل مجال واسع من درجات الحموضة ، تتراوح من pH 4-8 ولكن ليس لحموضة التربة تأثيراً على انتشاره ، وهو يتحمل الجفاف .

يمكن عزل الفطر *Aspergillus niger* AN 27 بسهولة من التربة حيث أنه يتواجد مترمماً فى التربة ، وينتج كميات كبيرة من الجراثيم الكونيدية ويهاجم الكائنات الممرضة فى البيئة الغذائية وفى التربة ، ويفرز مواد ناتجة عن التمثيل الغذائى ضد هذه الكائنات . إن سهولة تحرك هذا الفطر ومجال تأثيره الواسع ، يسهل الطريق لاستغلاله كعامل مقاومة حيوية.

## التركيبات التجارية للفطر *Aspergillus niger* AN 27

بالنظر إلى جميع الاعتبارات الهامة في تحضير الكائن الحي ، وجعله مناسباً للتداول في المقاومة الحيوية تحت ظروف بيئية مختلفة ، فلقد تم تحضير خمسة أنواع من التركيبات التجارية من هذا الفطر هي *Kalisena SL* ، *Pusa Mrida* و *Kala sipahi* وهي كبسولات . أما المركب الذى يستعمل لمعاملة التربة فهو المركب *Kalisena SD* ، أما لمعاملة البذور فهو المركب *Beej Bandhu* . الأربعة مركبات الأولى لها سقف حياة عال يمتد لأكثر من سنتين على حرارة من ١٥ - ٣٥ م ، عندما توضع فى أكياس من البولي إيثيلين وتخزن تحت درجات رطوبة نسبية أقل من ٨٠ ٪ . أن طرق تحضير هذا الفطر سهلة وقليلة التكاليف ، وكذلك فإن الحامل المستعمل غير خطير ويستعمل بأمان من قبل العمال وكذلك غير ضار على الكائنات الدقيقة الأخرى غير المقصودة بالمقاومة . أما المادة المستعملة فى معاملة البذور ، فهى لا تؤثر على نمو وخروج البادرة من البذرة . إن التركيب *Kalisena SD* يزيد إلى حد ما نسبة الإنبات وقوة البادرات . تكون التركيبات المذكورة فعالة فى التربة القلوية والحامضية ، وتحت ظروف رطوبة تربة عالية أو منخفضة وعلى درجات حرارة تتراوح ما بين ١٨ - ٤٥ م .

### التجارب الحقلية على الفطر AN 27

أجريت تجارب عديدة باستعمال هذا الفطر فى المقاومة الحيوية ، على عديد من المحاصيل والخضار وأشجار الفاكهة ، منها :

#### ١- الشمام :

عند معاملة البذور بالمركب *Kalisena SD* بنسبة ٨ غرام/كيلو غرام ومعاملة التربة بالمركب *Kalisena SL* بمعدل ٣٠ غرام/نقرة تزرع فيها البذرة ، حصل على نسبة وقاية ٨١ ٪ ضد ذبول الفيوزاريوم فى القرعيات ، وكانت النيمات أقرى حتى ولو كانت نسبة الإصابة المرضية ١٥ ٪ . كانت نسبة الانتاج تزيد بنسبة ٥ ٪ أعلى منه فى المناطق غير المعاملة (كنترول) . أصبحت تجمعات الفطر فيوزاريوم فى منطقة الرايزوسفير لنبات الشمام الناتج من بذور معاملة بالمادة *Kalisena SD* ، منخفضة بنسبة ٩٥ ٪ فى نهاية الشهر الثانى . كذلك تبين فى نفس المحصول أن الكائن الممرض غير قادر على التكاثرت وتوطيد نفسه فى نسيج الجذر بتجمعات مختلفة بنسبة ٨٧ ٪ أقل منه فى الكنترول . هذا يدل على وجود مقاومة مخلقة فى النباتات الناتجة من بذور معاملة .

لتأكيد هذه المعلومات السابقة ، أجريت تجارب معملية ، حيث نعت بذور الشمام لمدة ٢٤ ساعة في معلق جراثيم *Aspergillus niger* AN 27 ثم وضعت في الرمل لمدة ستة أيام . غسلت جذور هذه البادرات (الفلقات المفتوحة) في ماء جار للتخلص من جراثيم *A.niger* ثم وضعت هذه البادرات في معلق جراثيم الفطر *F. oxysporum melonis* . تبين أن بادرات الشمام الناتجة من بذور معاملة بالمادة Kalisena SD أظهرت ٥٦ ٪ مقاومة للفطر المرض دون تواجد فيزيائي للفطر *A. niger* في منطقة الجذر . كانت هذه البادرات ذات محتوى أعلى من الـ Phenylalanine ، Polyphenol oxidase ، Peroxidase ، ammonialyase بنسبة ٥٨ ٪ ، ٢٦ ٪ ، ٢ ٪ بالترتيب . كذلك فإن محتوى اللجنين يكون أكبر في أنسجة هذه النباتات . كانت نفس الظاهرة من المقاومة المستحثة مشاهدة في محاصيل أخرى .

## ٢- الأرز :

لوحظ أن بادرات الأرز الناتجة من حبوب معاملة بالمادة Kalisena SD تظهر نسبة ٣٠ ٪ خفضاً في مرض لفحة الغمد بالمقارنة مع الكنترول . كذلك فإن المعاملة شجعت نمو الجذور والفروع وشجعت زيادة أعداد الاضطاعات وكذلك لوحظ زيادة وجود كل من الـ Polyphenol oxidase ، Peroxidase .

## ٣- القرنييط :

عند معاملة بذور القرنييط بالمادة Kalisena SL وزراعتها في حقول ملوثة بالفطر المرض *Sclerotinia sclerotiorum* ، فإن ذلك أدى إلى نجاح الشتلات في مقاومة الفطر المرض واستمرارها في النمو وأعطت محصول جيد ، حيث أن الفطر *A.niger* AN 27 يتطفل ويقتل الأجسام الحجرية للفطر المرض ولا يسمح بتكوين أجسام حجرية جديدة في التربة .

## ٤- الخضار والفواكه :

إن مرض سقوط البادرات قبل أو بعد ظهورها فوق سطح التربة ، في كثير من بادرات الخضار أو غراس أشجار الفاكهة ، هي من المشاكل الكبيرة المتسببة عن الفطر *Pythium aphanidermatum* والفطر *R.solani* . أمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق معاملة البذور والتربة بالمواد Kalisena SD و Kalisena SL . بينما المعاملة بالمادة الأولى تحفظ

البيذور من العفن الميكروبي والسقوط قبل الظهور فوق سطح التربة ، فإن المعاملة بالمادة الثانية تجعل حبيبات الفطر المضاد *A.niger* تنتشر في التربة وتحفظ النباتات عن مهاجمة الكائن الممرض في الأطوار الأخيرة . إن معاملة التربة اجراء أساسى للحصول على وقاية تصل ٩٥ ٪ ، هذا يعتمد على المدة الفاصلة بين معاملة التربة ووقت الزراعة وعلى درجات الحرارة المعينة . عند حرارة التربة ما بين ٢٧ - ٣٥ م ، والمدة عشرة أيام قبل الزراعة تكون كافية وفعالة ، يجب أن تجرى معاملة التربة قبل الزراعة بمدة ١٥ - ٢٠ يوم .

#### ٥ - البطاطس :

تبين من الدراسة الحقلية أن درنات البطاطس الناتجة من تقاوى غير معاملة بمركبات الفطر *A.niger* تظهر نسبة إصابة حوالى ٧٧ ٪ ، بالمقابل ١٠ ٪ فى النباتات الناتجة من درنات معاملة (إصابة بادرات) . فى هذه الحالة يكون الكائن الممرض موجوداً فى التقاوى وفى التربة . يحدث زيادة بنسبة ١٠ ٪ فى انتاج المحصول فى النباتات المعاملة ، وبالمثل فإنه قد تم الحصول على مقاومة بنسبة ٩٣ ٪ ضد مرض العفن الفحيمى فى البطاطس المتسبب عن *Macrophomina phaseolina* الملوث للتربة ، بالمقابل كانت نسبة الإصابة ٨٧ ٪ فى الأراضى غير المعاملة . كذلك فإن معاملة التقاوى سببت زيادة فى انتاج محصول البطاطس فى التربة العادية بنسبة ١٨,٥ ٪ . كذلك فإن معاملة التربة بتركيبات *Kalisena* خفضت تجمعات الفطر *M.phaseolina* بنسبة ٧٩ ٪ . عند دراسة الرايزوسفير فى البطاطس وجد أن تجمعات الفطر *A.niger* تزداد بنسبة ١٥٠ ٪ فى نهاية موسم النمو تحت ظروف الحقل . يمكن لهذه التجمعات أن تنمو وتتكاثر جيداً على الرايزوبلين والرايزوسفير لنبات الحمص والقرنبيط . وبالتالي يمكن القول بأن *A.niger* AN 27 تشارك فى المنافسة فى منطقة الرايزوسفير ، وهذا دليل واضح على نجاح تواجد هذا الفطر المضاد فى منطقة الرايزوسفير .

#### ٦ - الذرة :

عند معاملة حبوب الذرة بالمركب *Kalisena* SD فإنه خفض الإصابة بالفطر *Macrophomina* من ٣٠ ٪ إلى ٧ ٪ .

#### ٧ - العصفر *Safflower*

يهاجم نبات العصفر بالفطر *F. oxysporum carthami* حيثما زرعت البيذور . عند معاملة البيذور بالمركب *Kalisena* SD بنسبة ٤ غرام/ كيلو غرام بذور ، فهو يخفض حدوث

المرض من ٦١ ٪ فى الكنترول إلى ١٩ ٪ فى النباتات المعاملة . وكذلك فإنه يزيد من نسبة إنبات البذور وسلامة النباتات وزيادة الانتاج .

### تشجيع نمو المحاصيل :

لقد ذكر سابقاً أن بادرات القرنييط ، قد حصل لها وقاية من مرض سقوط البادرات المتسبب عن بعض أنواع الجنس *Pythium* والفطر *R.solani* . إن معاملة البذور والتربة بالمركب *Kalisen* يزيد نسبة البادرات الناجية من الاصابة بنسبة ٤٥ ٪ عند معاملة البذور وتصل النسبة ١٤١,٥ ٪ عند معاملة التربة ، هذا ما وجدته *Sen et al* سنة ١٩٩٨ . وبالمثل حصل تشجيع فى نمو نبات *Brinjal* . وقد ذكرت زيادة المحصول فى كثير من النباتات التى ذكرناها سابقاً .

هذا أدى إلى القول بأن هناك مواد يفرزها الفطر *A.niger AN 27* تؤدي إلى تشجيع نمو النبات . بعد التجارب المستمرة فى هذا الموضوع ، أمكن عزل مركبين مشجعين للنمو من هذا الفطر ، عرف هذين المركبين على أساس أن المركب الأول

2- Carboxy methyl 3-n hexyl maleic acid

2- methylene -3- hexyl butanedioic acid

والمركب الثانى

المركب الأول أكثر فعالية فى زيادة إنبات نمو بادرات القرنييط ، بينما الثانى أكثر تشجيعاً لنمو الجذور . كان هذان المركبين فعالين على تركيز ٢,٥ جزء فى المليون ، وهما يشبهان مشجعات النمو الأخرى ، حيث أنها تكون ضارة إذا استعملت بتركيزات عالية .

### حقائق عن الفطر *Aspergillus niger*

١ - لا يدخل هذا الفطر ضمن قائمة الأنواع السامة ، من الأنواع التابعة للجنس *Aspergillus* المسئولة عن تكوين سموم فطرية *mycotoxins* فى المواد الغذائية للإنسان والحيوان . تبين فى جميع التجارب أن هذا النوع لا يفرز سموم فطرية وقد ثبت ذلك بالتجارب على الفئران .

٢ - لقد ثبت بأن هذا الفطر يقلل من نسبة التلوث بالأفلاتوكسن ، وقد يعود ذلك إلى كون هذا الفطر يشارك فى تخفيض رقم الحموضة فى المادة التى يكون متواجداً فيها ، وإلى المواد المثبطة التى ينتجها والتى تحطم الإفلاتوكسن .

٣ - لقد ثبت بأن مرض الـ *Aspergillosis* والذي يصيب الرئة في الحيوانات ذات الدم الحار ، يعود في معظم الحالات إلى الفطر *A. fumigatus* وبنسبة بسيطة إلى *A. flavus* وبنسبة أقل إلى كل من *A. niger* ، *A. nidulans* ، *A. terreus* . إن الهجوم الصغيرة التي تتميز بها الجراثيم الكونيدية للفطر *A. fumigatus* يجعلها تخترق بسرعة (alveoli) للرئة أسرع منه في الجراثيم الكونيدية الكبيرة ، كما في *A. niger* و *A. flavus* .

٤ - لقد ذكر أن الفطر *A. niger* يسبب مرض لفحة البادرات في القطن وفي الفول السوداني، إلا أن التجارب العديدة والدقيقة أثبتت أن نباتات القطن لا تظهر أية لفحة بادرات عند معاملة البذور بالمركب *Kalisena SD* بنسبة ٢ ، ٤ ، ٦ و ٧ بعد جمع المحصول وتهيئة التربة للمحصول القادم . لم يكن هناك أية اختلافات في تجمعات *A. niger* (١-١٠) × ١٠<sup>٧</sup> وحدة تكوين مستعمرات/غرام تربة ، بين الحقول التي زرعت فيها البذور معاملة والتي زرعت فيها البذور غير معاملة . ولو أن الفطر *A. niger* يسبب لفحة بادرات في الفول السوداني أو القطن ، لكانت المعاملة بالمركب *Kalisena SD* سبباً في زيادة الإصابة ، وهذا لم يحدث مما يدل على أن الفطر بريئاً من هذه التهمة وبالتالي يمكن نقل السلالة *AN 27* من قائمة الفطريات الممرضة إلى غير الممرضة .

٥ - هناك فوائد عملية زراعية وصناعية للفطر *A. niger* ، منها :

أ - يستخدم هذا الفطر تجارياً لإنتاج حمض السترك ، والذي يستعمل بكثرة في الطعام ، الكيماويات والصناعات الصيدلانية .

ب - بقايا الميسيليوم من الفطر *A. niger* الباقية من تصنيع حمض السترك ، تستعمل في تصنيع *Chitosan* ، وهذا الأخير يستعمل بشكل واسع في الزراعة ، مستحضرات التجميل ، الطعام والصناعات الدوائية .

ج - يستخدم الفطر *A. niger* تجارياً لإنتاج إنزيمات مهمة في التجارب الزراعية والصناعية .

د - يلعب الفطر دوراً مهماً في إذابة الفوسفات .

هـ - للفطر دور فعال موجب في علاقته مع فطريات الميكوريزا نوع *arbuscular* وبالتالي يشجع نمو النبات وقوته .

## VI : الجنس *Pythium Oligandrum*

لقد ذكرت كفاءة الفطر المذكور أعلاه كعامل مقاومة حيوية لمقاومة أمراض سقوط البادرات وأمراض الجذور من قبل كثير من الباحثين . نظراً لأن هذا الفطر ينمو في منطقة الرايزوسفير لمدى واسع من المحاصيل الزراعية الهامة ، ويستمر وجوده في هذه المنطقة لمدة طويلة ، لذا اتجه الاهتمام لاستعماله في المقاومة الحيوية ضد مدى واسع من أمراض الجذور.

يتطفل هذا الفطر على مدى واسع من الفطريات الممرضة للنبات ، وقد ثبت ذلك من تجارب عدة علماء ، حيث وجد أن هذا الفطر يتطفل على أنواع من *Pythium* وعلى الفطر *Verticillium dahliae* . يشمل تطفل هذا الفطر حصوله على المغذيات عن طريق الالتفاف واختراق وتحطيم خلية العائل (الفطر الذى يتطفل عليه) لا ينتج هذا الفطر مركبات مثبطة قابلة للانتشار ، ولكن يمكن أن ينتج مضادات حيوية متطايرة على بعض البيئات الغذائية والتي تثبط نمو بعض الفطريات .

أجريت دراسة لعدد من الفطريات ، لمعرفة مدى قابليتها أو مقاومتها للمهاجمة بهذا الفطر بعدة طرق مختلفة . تشمل هذه الطرق ، تقدير كمية النمو للفطر *P. oligandrum* فوق مستعمرات العائل في المزرعة والالتفاف حول هيفات العائل ، وكذلك تقدير الخفض في نشاط الإنزيمات المحللة للسيليلوز ، بواسطة فطريات العائل النامية على ورق ترشيح في وجود الفطر المضاد . وكذلك تحديد معدلات تحطم السيتوبلازم في هيفا العائل القابل للاصابة عند ملامسته للفطر المضاد ، وقياسات التركيبات التكاثرية لهذا الفطر المنتجة في منطقة التفاعل .

تظهر نشاطات التطفل الفطرى عادة ، في النموات الخضرية ثم يتبع ذلك تكوين التركيب التكاثرى الأنثوى ثم تكوين الجراثيم البيضية .

لقد ذكر أن الفطر *P. oligandrum* يشجع تفاعلات الدفاع في جذور الطماطم ضد الاصابة بالفطر *F.oxysporum f. sp. radices lycopersici* .

## ثانياً : الأجناس البكتيرية

### I : الجنس *Pseudomonas*

#### مقدمة

أفراد هذا الجنس بكتيريات على شكل عصيات مستقيمة ، إلى منحنية ، ذات أبعاد  $(1 - 0,5) \times (4 - 1,5)$  ميكرون ، متحركة بواسطة سوط واحد أو أكثر . يوجد أنواع كثيرة من هذا الجنس شائعة كمستوطنات تربة أو الماء النقى أو مع الأحياء البحرية . معظم الأنواع الممرضة من هذا الجنس تصيب النبات ، قليل منها يصيب الحيوان أو الإنسان .

بعض الأنواع من هذا الجنس تسمى بكتيريا وميضة (لامعة) وذلك لأنه عند تنميتها على بيئة غذائية منخفضة المحتوى من الحديد ، تنتج صبغات لامعة منتشرة خضراء مصفرة . البعض الآخر لا ينتج صبغات لامعة ، وتشكل مجموعة بسيدوموناس عديمة الصبغات .

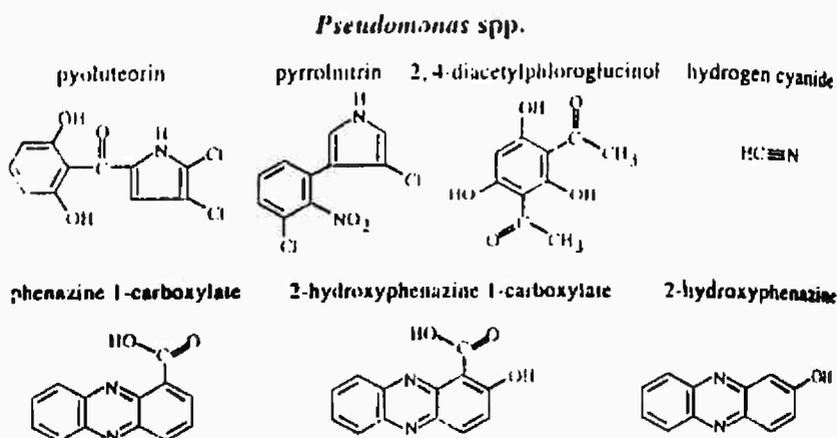
أهم الأنواع التى تدخل فى المقاومة الحيوية لأمراض النبات هى *Pseudomonas flu-* خاصة السلالة *CHAO* . والنوع الثانى *P.putida* والثالث *P.aevuginosa* .

#### السلالة *P.fluorescence CHAO*

هناك بعض السلالات من البكتيريا الوميضة *P.fluorescence* المستعملة لجذور النبات ، تستطيع أن تثبط أمراضاً نباتية مختلفة كآمنة فى التربة ، وبالتالي تزيد النمو وكمية الانتاج فى المحاصيل الزراعية . يكون تثبيط الكائنات الممرضة التى تهاجم الجذور ، عن طريق انتاج مواد تسمى مضادات ميكروبات أو مركبات حديد مخلبية *Iron - Chelating metabolites* . هذه المواد يعتمد عليها فى الميكانيكية الأساسية فى تثبيط الأمراض بواسطة هذه البكتيريا . أهم المواد التى لها دور فعال فى تثبيط الأمراض هى :

- 1 - Phenazine -1- Carboxylic acid.
- 2 - Hydrogen Cyanide.
- 3 - 2,4- diacetyl phloroglucinol (Phl).
- 4 - Oomycin A.
- 5 - Pyoluteorin (Plt).
- 6 - Pyrrolnitrin.

يبين (شكل ١٣) الصيغ الكيميائية لبعض هذه المركبات :



شكل رقم (١٣) : بعض المركبات الكيميائية التي تفرزها أنواع مختلفة من البكتيريا الوميضة ، ولها دور في تثبيط الأمراض النباتية .

أثناء نمو البكتيريا تحت ظروف محدودة في كمية الحديد ، فإن البكتيريا الوميضة ينطلق منها مبيض معين ، وتنتج سايدروفورز خضراء مصفرة يطلق عليها Pyover- (Pvd) dines أو تسمى Pseudobactins . السايدروفورز تجعل الحديد تركيباً معقداً مع التربة ؛ مما يجعله أقل توفراً للكائن الممرض . إن الدليل على دخول الـ (Pvd) في تثبيط الأمراض ، قد جاء من الدراسات التي أجريت على تنقية الـ Pvd (مقارنة مع مركبات الحديد المخليبية والظفرات السالبة لـ Pvd) .

لقد استعمل المركب Pvd في المقاومة الحيوية للفطر *Pythium sp* ، *Fusarium sp* ، والبكتيريا *Erwinia carotovora* . ومع ذلك فإنه في عدد من سلالات *Pseudomonas* فإن الـ Pvd يظهر دوراً بسيطاً جداً في تثبيط الأمراض . هناك معلومات قليلة معروفة عن السايدروفور Pyochelin (Pch) ، البادئ الأساسي له هو حمض السلسليك (SA) وهذا ينتج بواسطة بعض سلالات *Pseudomonas* . لقد ذكر بأن Pch يشارك في مقاومة الفطر *Pythium* على نباتات الطماطم حيث تفرزه السلالة *P.aeruginosa* .

عزلت البكتيريا *P. fluorescens CHAO* ، أصلاً من تربة مثبطة لمرض العفن الأسود لجذور الدخان ، حيث وجد أنها تقمى نباتات مختلفة من أمراض الجذور المتسببة عن أنواع مختلفة من الفطريات الممرضة النباتية . هناك نواتج تمثيل ثانوية عديدة تنتج بواسطة السلالة *CHAO* ، قد ثبت بأنها تلعب دوراً في تثبيط المرض ، هذا ما وجدته Ked & Defago سنة 1969 ، أهم هذه النواتج هما HCN و Phl حيث يساعدان في تثبيط العفن الأسود في الدخان . كذلك وجد أن الـ Phl يدخل في تثبيط المرض الماحق (Take all) في القمح . أما المركب Plt فقد وجد أنه يساهم أيضاً ، في وقاية بعض أنواع النباتات ، من الإصابة بمرض سقوط البادرات المفاجئ ، إلا أن هناك أدلة واضحة تبين أن دخول Pvd المذكور سابقاً في المقاومة الحيوية لأمراض الجذور غير أكيد . كذلك فإن السلالة *CHAO* تنتج أيضاً Pch و SA ولكن دورهما في تثبيط الأمراض لم يدرس جيداً .

إن الجين الكروى المنظم Global activator والذي يطلق عليه Gac A في السلالة المذكورة سابقاً ، ينظم سلوك عديد من نواتج التمثيل الثانوية من HCN ، Phl و Plt وإنزيمات Tryptophan side-chain oxidase ، وأنزيم Protease و Phospholipase C . إن جين تنظيم الاستجابة Gac A وجين تطابق الإحساس Lem A هما مكونان مهمان في الجنس *Pseudomonas* . إن الجين Gac A غير مطلوب لإنتاج مركبات الحديد المخيلية في السلالة *CHAO* ، ولكن في الطفرات السالبة لإنتاج Gac A من *P. fluorescens* سلالة BL 915 ، فإنها تفضل في بناء عديد من عوامل المضادات الفطرية مثل HCN و Pyrrolnitrin ، وتضعف كفاءتها في تثبيط الأمراض . أيضاً وبطريقة مماثلة فإن الطفرات السالبة لإنتاج Gac A من السلالة *CHAO* ، تكون مقدرتها على تثبيط عفن الجذر الأسود في الدخان منخفضة بشدة بالمقارنة مع السلالة الأصلية موجبة الإنتاج للجين Gac A .

كذلك فإن السلالة *CHAO* تثبط عديداً من الأمراض النباتية المختلفة المتسببة عن فطريات كامنة في التربة . تنتج البكتيريا الوميضة مواد مضادة ميكروبية ذكرناها سابقاً ، والتي كلها ضرورية لتثبيط المرض ، إلا أن هناك مشتقات من السلالة *CHAO* ذات طفرة في الجين الكروى المنظم (Gac A) والذي يعد غير قادر على إنتاج Phl ، Plt ، HCN ، وهذا

يفشل في وقاية نباتات ذات الفلقتين مثل Cress ، والخيار ضد مرض سقوط البادرات المتسبب عن الفطر *Pythium ultimum* . وبالمقابل فإن الطفرات السالبة لانتاج Gac A تستطيع أن تقى نباتات ذات الفلقة الواحدة وخاصة النجيليات مثل القمح والذرة من سقوط البادرات والذي يتسبب عن الفطر السابق نفسه . وتحفظ القمح من الإصابة بالمرض الماحق . وعلى أية حال فإن الطفرات السالبة في انتاج Gac A ، تنتج كثيراً من Pch و Pvd . للحصول على تفسير أكبر للوقاية من المرض الذي يتم بواسطة السلالة السالبة لـ Gac A ، يجب دراسة الطفرات الثنائية السالبة في انتاج Gac A و Pvd مثل السلالة CHA-496 التي أنشئت عن طريق الإحلال الجيني .

تنتج السلالة CHA-496 كميات كبيرة من Pch و Sal بالمقارنة مع السلالة CHAO ، وتحفظ القمح من الإصابة بالفطر *P.ultimum* و *Gaeumannomyces graminis* مسبب المرض الماحق في القمح (جدول رقم ٨٧) ، بينما نبات الـ Cress والخيار لم يمكن حفظهما . إن إضافة كلوريد الحديدك يكبح انتاج Pch و Sal بواسطة السلالة CHA-496 في المعمل ، ويفسد وقاية النبات في عالم التربة الصغير .

يمكن القول باختصار أن وظيفة الجين Gac A ضرورية لوقاية نباتات ذوات الفلقتين ضد أمراض الجذور ، وليست ضرورية لنباتات الفلقة الواحدة خاصة النجيليات . كذلك يمكن القول بأن Pch و / أو Sal تكون داخلة في مقدرة الطفرة المزدوجة السلبية في انتاج Pvd و Gac A من السلالة CHAO لكبح أمراض جذور العائلة النجيلية .

جدول رقم (٨٧) : تأثير الحديد على تثبيط مرض سقوط البادرات المتسبب عن الفطر *P.ultimum* والمرض الماحق في القمح المتسبب عن الفطر *G.g.tritici* بواسطة استعمال البكتيريا *P.fluorescens* سلالة CHAO ، وطفرة CHA-496 السالبة الانتاج لكل من Gac A و Pvd .

| تقدير المرض الماحق في القمح |                         | تقدير سقوط البادرات |                         | الحديد | السلالة البكتيرية |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|--------|-------------------|
| دليل المرض                  | الوزن الطازج للنبات ملغ | % إصابة مرضية       | الوزن الطازج للنبات ملغ |        |                   |
| بدون مع فطر                 | بدون مع فطر             | بدون مع فطر         | بدون مع فطر             |        |                   |
| صفر ٢,٤                     | ٦٢٧ ٣٠٣                 | صفر ٨٠              | ٦١٥ ٣٣٣                 | --     | كترول             |
| صفر ٠,٧                     | ٦٢٣ ٦٢٤                 | صفر ٤٠              | ٥٧٨ ٤٤٩                 | --     | CHAO              |
| صفر ١,٧                     | ٦٣٦ ٥١٥                 | صفر ٣٥              | ٥٩٧ ٤٥٢                 | --     | CHA-496           |
| صفر ٢,٣                     | ٥٩٢ ٣٢٦                 | صفر ٨٠              | ٥٧٨ ٢٩٤                 | +      | كترول             |
| صفر ٠,٤                     | ٥٨٥ ٥٥٩                 | صفر ٧٥              | ٥٨٠ ٤١٩                 | +      | CHAO              |
| صفر ٢,٠                     | ٥٦٤ ٣٩٤                 | صفر ٧٠              | ٥٧٠ ٣٣٧                 | +      | CHA-496           |

#### ملاحظات على الجدول :

السلالة CHAO هي الأصلية أما CHA-496 فهي طفرة من السلالة الأصلية لا يوجد فيها Gac A ولا Pvd . كان يضاف الحديد على شكل كلوريد الحديديك إلى التركيز النهائي من ٩,٩ ميكروغرام حديد / g<sup>-1</sup> من التربة الجافة . كان دليل المرض يقسم من صفر إلى ٤ ، حيث إن صفر بدون مرض ، أما ٤ تموت النباتات (Keet et al سنة ١٩٩٢) .

إن إدخال Cosmid pME 3090 إلى البكتيريا الوميضة سلالة CHAO التي هي عامل مقاومة حيوية جيد ، ضد أمراض نباتية مختلفة ، متسببة عن كائنات ممرضة كامنة في التربة ، يضاعف انتاج المضادات الحيوية الناتجة عن التفاعلات الأيضية بمقدار ٣ - ٥ أضعاف ، هذه المضادات هي PhI و Plt في المعمل . السلالة CHAO/pME 3090 ، أيضاً تنتج كمية كبيرة من الـ PhI و Plt في منطقة الرايزوسفير في القمح المصاب أو غير

المصاب بالفطر *P.ultimum* . إن كفاءة المقاومة الحيوية ، للسلالة الأصلية والسلالة المركبة قد تم مقارنتهما باستعمال اتحادات من العائل - الكائن الممرض المختلفة فى نظام الجينوتايب . لا تتأثر وقاية القمح بالانتاج الكبير من المضادات الحيوية ، لا الوقاية ضد *P.ultimum* ولا ضد فطر المرض الماحق *G.g.tritici* ولا يتأثر نمو نبات القمح . وبالمقابل فإن السلالة المركبة CHAO/pME 3090 أظهرت زيادة كبيرة فى وقاية الخيار من مرض ذبول الفيوزاريوم وفطر *Phomopsis sclerotioides* بالمقارنة مع السلالة الأصلية *CHAO* . السلالات المنتجة كميات كبيرة من المضادات الحيوية ، تحفظ جذور نبات الدخان بشكل معنوى أفضل ضد الفطر *Thielaviopsis basicola* من السلالة الأصلية ، ولكن تخفض بشكل كبير نمو نباتات الدخان ، وتكون سامة أيضاً على نمو نباتات الذرة السكرية . عندما تنمو السلالة المركبة على بيئة King's Bagar أو مولت آجار ، فإنها تثبط جميع الكائنات الممرضة بشكل أفضل مما تعمله السلالة الأصلية *CHAO* . إن مادتي *PhI* و *Plt* المصنعتين كانتا سامتين لجميع الفطريات المختيرة . كانت نباتات الدخان ونباتات الذرة السكرية أكثر حساسية لتلك المادتين المصنعتين من نباتات الخيار والقمح . لا توجد علاقة بين حساسية الكائن الممرض للمضادات الحيوية المصنعة ، ودرجة تثبيط المرض بواسطة السلالة المركبة المذكورة سابقاً . وكذلك لا يوجد علاقة بين حساسية النبات وسمية السلالة المركبة . وبالتالي يمكن القول بأن الأنواع النباتية أفضل من الكائن الممرض فى تحديد فيما إذا كانت *Cos-* mid pME 3090 فى *P.fluorescens* السلالة *CHAO* تؤدي إلى تحسين المقاومة الحيوية وتثبيط المرض (جدول رقم ٨٨) .

جدول رقم (٨٨) : درجة تثبيط الفطريات الممرضة النباتية بواسطة السلالتين البكتيريتين الأصلية والمركبة على أطباق الآجار .

| التثبيط ملم على بيئة مولت<br>آجار |      | التثبيط ملم على بيئة<br>King's agar B |      | الفطر المستعمل في التجربة           |
|-----------------------------------|------|---------------------------------------|------|-------------------------------------|
| CHAO/ρME<br>3090                  | CHAO | CHAO/ρME<br>3090                      | CHAO |                                     |
| ٤,٢                               | ١,٧  | ١٠,٨                                  | ٣,٢  | <i>Pythium ultimum</i>              |
| ١٦,٨                              | ١٣,٥ | ١١,٣                                  | ١٠,٤ | <i>G.graminis var. tritici</i>      |
| ١٣,٦                              | ١٠,٤ | --                                    | --   | <i>Thielaviopsis basicola</i>       |
| ٥,٧                               | ٣,٧  | ٥,٦                                   | ٣,٦  | <i>Rhizoctonia solani</i>           |
| ٨,٨                               | ٤,٥  | ١,٢                                   | ٠,٧  | <i>F.oxysporum f.sp cucumerinum</i> |

ملاحظات على الجدول :

يقاس تثبيط نمو الفطر (ملم) بين حافة ميسيليوم الفطر والمستعمرة البكتيرية (-) الفطر ينمو ضعيف جداً .

أما النوع الثانى فهو *Pseudomonas cepacia* فقد تغير اسمه وأصبح *Burkholderia cepacia* . تقاوم هذه البكتيريا عديداً من الأمراض منها :

- ١ - سقوط بادرات الذرة قبل وبعد ظهورها فوق سطح التربة وذلك بالسلالة PHQM 100 .
- ٢ - عفن الجلد التنن ، فى البصل ، بالسلالة المعزولة من جذور الذرة أما السلالة ATCC 25416 فهى تسبب المرض .
- ٣ - عفن جذور الفجل ، البسلة وعباد الشمس .

## Bacillus الجنس : II

### مقدمة

أفراد هذا الجنس بكتيريات عسوية هوائية أو غير هوائية اختياريًا . تكون جراثيم داخلية ، تتحرك عن طريق أسواط جسمية ، بعض الأنواع غير متحرك ، الجراثيم الداخلية بيضاوية أو كروية ، موجبة لصبغة غرام . بعض الأنواع مختلفة التفاعل مع هذه الصبغة ، موجبة لاختبار الكاتاليز . أنواع هذا الجنس غالبيتها رمية والبعض منها يصيب الحيوانات والحشرات مسبباً لها أمراضاً . النوع المثالي لهذا الجنس *Bacillus subtilis* .

أنواع هذا الجنس ، كمجموعة ، تبدى كثيراً من الفوائد أكثر من التي تبديها البكتيريا الوميضة أو البكتيريا الأخرى موجبة غرام ، وذلك عند استعمالها كعامل بذور (تلقيح بذور) لوقاية هذه البذور من الكائنات المرضية التي تهاجم الجذور . تتميز هذه البكتيريا بأنها ذات سقف حياة طويل Longer shelf life وذلك لمقدرتها على تكوين جراثيم داخلية ونشاطها في إنتاج مضادات حيوية ذات مدى واسع التأثير .

من أكثر السلالات معرفة وذات أهمية كبيرة في المقاومة الحيوية هي *B.subtilis* A13 . عزل هذا الكائن منذ ٢٥ سنة في استراليا (هذا ما ذكره Broadbent سنة ١٩٧١) . اختيرت هذه السلالة على أساس مقدرتها التثبيطية في المعمل لعديد من الكائنات المرضية ، وتبين أيضاً أنها تشجع نمو كثير من النباتات مثل الحبوب ، الذرة الرفيعة ، الجزر وغيرها ، عند استعمالها حقناً في البذور .

هناك سلالة مهمة أخرى هي *B.subtilis* GBO-3 وهي تباع الآن في الولايات المتحدة تحت اسم Kodiak لمقاومة مرض سقوط البادرات أساساً في القطن . إن السلالات ذات التأثير الواسع المدى مطلوبة في المقاومة الحيوية ، وخاصة على بعض المحاصيل ، مثل القمح الذي يضر مباشرة ، والذي عندئذ يمكن أن تهاجم جذوره مباشرة بأى من الفطريات التابعة للمجموعات Oomycetes ، Basidiomycotina ، Acomycotina . ولقد ذكر Faul و Campbell سنة ١٩٧٩ أن المرض الماحق في القمح قد أمكن تثبيطه ، وأن هيفات الفطر المسبب للمرض وهو *G.graminis* var. *tritici* قد تحللت على جذور القمح المحقونة في الحقل بمعلق من خلايا البكتيريا المسماة *B.cereus* var *mycoides* المعزولة أساساً من

التربة المحتوية مسبب المرض . ولكن هل تستطيع هذه البكتيريا مقاومة المرض الماحق في الحقول الملوثة طبيعياً بالكائن المرض عند إدخالها في التربة على شكل معاملة بذور ؟؟ هذا غير واضح تماماً لغاية سنة ١٩٩٧ ، ولكن كثيراً من نتائج التجارب تبشر بالنجاح التام .

تعتبر أنواع الجنس *Bacillus* كمجموعة ، أقل فعالية وكفاءة في استعمار منطقة الرايزوسفير بالمقارنة مع البكتيريا الوميضة . وعلى أية حال هناك أبحاث مستمرة ومنتالية تذكر قوائم طويلة من الكائنات التي تستعمر منطقة الرايزوسفير ، وتسبب أمراض الجذور ويمكن مقاومتها بأنواع *Bacillus* عند إدخالها في التربة كمعاملة بذور .

من تلك الأمثلة ما يلي :

١ - *B.cereus UW85* لمقاومة مرض سقوط البادرات في البرسيم الحجازي وأمراض أخرى كثيرة .

٢ - *B.megaterium B153-2-2* لمقاومة مرض العفن الرايزوكتوني في جذور فول الصويا .

٣ - *B.subtilis GBO-3* لمقاومة مرض سقوط البادرات في القطن .

٤ - *B.mycoides* لمقاومة المرض الماحق في القمح .

ذكرت بعض التجارب التي أجريت في الصين ، نجاح استعمال أنواع من البكتيريا *Ba-cillus* كعوامل تسبب زيادة الانتاج ، عند إدخالها للتربة كمعاملة بذور ، على عديد من المحاصيل النباتية ، من ضمنها القمح والرز . ولقد ذكر *Mavingui et al* سنة ١٩٩٢ أن تجمعات *B.polymyxa* ، في منطقة الرايزوسفير والرايزوبلين تختلف عن تلك الموجودة في Bulk soil ، ومن الممكن عزل سلالات من أنواع *Bacillus* والتي يمكن أن تكون ذات كفاءة رايزوسفيرية في القمح ، أو ذات نشاط فعال ضد مدى واسع من الكائنات الممرضة النباتية في جذور القمح .

#### السلالة *B.cereus UW-85*

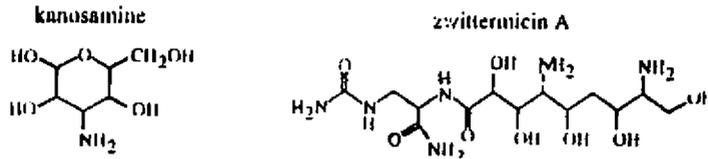
لهذه السلالة مدى واسع في المقاومة الحيوية في كثير من النباتات ، فهي تقى بادرات البرسيم الحجازي من الإصابة بمرض السقوط المتسبب عن *Phytophthora medicaginis* وبادرات الخيار من الإصابة بالفطر *P.nicotianae* ، وثمار الخيار من العفن المتسبب عن

الفطر *Pythium aphanidermatum* ، والفول السوداني من الإصابة بالفطر *Sclerotinia minor* ، وهى أيضاً تزيد وتشجع نمو بكتيريا العقد الجذرية على فول الصويا ، وتسبب تغيرات حقيقية فى العلاقات البكتيرية على جذور فول الصويا .

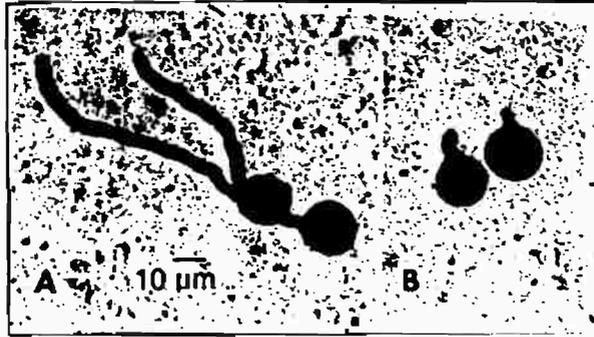
إن تثبيط مرض سقوط بادرات البرسيم الحجازى فى المعمل ، يكون مترافقاً مع ظهور أجزاء من المضادات الحيوية خارجة من الخلية فى المزارع البكتيرية كاملة التجزئ فى السلالة المذكورة . وقد تبين أن هناك نوعين من المضادات الحيوية تفرزهما هذه السلالة فى المزرعة (شكل ١٤) .

إن المستعمرات والراشحات البكتيرية ، المأخوذة من المزارع البكتيرية للبكتيريا *B.cereus* UB-85 ، تشبط سقوط البادرات المذكورة سابقاً ، وذلك لأنها تفرز نوعين من المضادات الحيوية ، الأول يسمى Zwittermicin A (شكل ١٤) وهو Aminopoly مكون من ٣٩٦ Da والذي هو كايونك على pH7 . أما الثانى فيتكون من Antibiotic-B ومن المتوقع أن يكون اسمه Kanosamine ، ويبدو أنه يتكون من Aminoglycoside يحتوى سكريات ثنائية . كلا النوعين من المضادات الحيوية يمنع المرض عن بادرات البرسيم الحجازى . عند تنقية النوع الأول ، فإنه يخفض استطالة أنابيب الإنبات الناتجة من حويصلات الفطر *P.medicaginis* (شكل ١٥) . أما المضاد الثانى فهو يسبب انتفاخاً فى أنبوبة الإنبات وبالتالي يفقدها المقدرة على إحداث المرض (جدول رقم ٨٩) .

### *Bacillus cereus*



شكل رقم (١٤) : التركيب الكيماوى للمضادات الحيوية، التى تفرزها البكتيريا *B.cereus* سلالة UB-85



شكل رقم (١٥) : تأثير المضاد الحيوى Zwittermicin A على إنبات حويصلات الفطر *Phytophthora medicaginis* بعد ساعتين من نقله إلى البيئة الغذائية المناسبة . A = غير معاملة . B = معاملة بكمية ١٠٠ ميكرو غرام / مل من المضاد الحيوى ..

أما بالنسبة السلالات الناتجة من الطفرات باستعمال Tn 917 أو مادة Mitomycin ، وجد أنه من بين ٢٦٨٢ طفرة ، هناك خمس طفرات فقط ، تخفض تجمع المضادات الحيوية وذات نشاط عال في تخفيض المرض ، ومن بين ١٧٠٠ طفرة هناك ثلاث طفرات ذات كفاءة منخفضة في تخفيض المرض ، وتجمع المضادات الحيوية بكمية أقل من السلالة الأصلية . إن كمية المضادات الحيوية التي تتجمع بواسطة الطفرات ، تكون مرتبطة معنوياً مع مستوى تخفيض المرض . إن إضافة المضادات - سواء الأولى أو الثانية - إلى نباتات البرسيم الحجازى ، المحقونة بمزرعة طفرة غير مثبطة للمرض ، يؤدي إلى تثبيط المرض . هذه النتائج تؤدي إلى القول بأن البكتيريا *B.cereus UW-85* تفرز نوعين من المضادات الحيوية ذات تأثير مطهر للفطريات Fungistatic ، والتي تشارك في تثبيط مرض سقوط بادرات البرسيم الحجازى .

أما بالنسبة للطفرة *UW030* ففي جدول (رقم ٩٠) ، يتبين تأثير هذه الطفرة ، حيث أنه بدون إضافة المضاد الحيوى يكون تأثيرها على تخفيض المرض قليلاً جداً ، مما يدل على أنها لا تفرز أيّاً من المضادات الحيوية المذكورة سابقاً .

جدول رقم (٨٩) : تثبيط استطالة أنبوبة الإنبات ، للجراثيم الهدبية للفطر *P. medicaginis* بالمضادات الحيوية المفزة من قبل البكتيريا المضادة .

| ميكرومتر طول أنبوبة الإنبات تحت تأثير تركيزات المضادات الحيوية ميكوغرام/مل |     |     |     |     |     |     |     |     | المضاد الحيوى             |
|----------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------|
| ١٠٠٠                                                                       | ٧٥٠ | ٥٠٠ | ٢٥٠ | ١٠٠ | ٧٥  | ٥٠  | ٢٥  | صفر |                           |
| --                                                                         | --  | --  | --  | ١٤٠ | ٢١٠ | ٢٤٠ | ٢٩٠ | ٣٤٠ | Zwittermicin A            |
| ١٩٠                                                                        | ٢٠٠ | ٢٠٨ | ٢١٠ | --  | --  | --  | --  | ٢٨٠ | Kanosamine (Antibiotic B) |

ملاحظات على الجدول :

كانت الجراثيم الهدبية تعامل لمدة ٤ ساعات بواحد من المضادات الحيوية .

جدول رقم (٩٠) : تأثير المضادات الحيوية على تثبيط مرض سقوط البادرات ، هذه المضادات مفزة بواسطة الطفرة UW030 .

| المعاملة               | المضاد الحيوى المضاف ميكوغرام / أنبوبة اختبار | % النباتات السليمة |
|------------------------|-----------------------------------------------|--------------------|
| 50 % TSB + Pm          | --                                            | ٧                  |
| UW - 85 + Pm           | --                                            | ٧٦                 |
| UW 030 + Pm            | --                                            | ٠٩                 |
| UW 303 + Pm + Zm A     | ٢٠                                            | ٤٣                 |
| UW 030 + Pm + Zm A     | ١٠٠                                           | ٩٨                 |
| UW + Pm + Antibiotic B | ٦٠                                            | ١٧                 |

ملاحظات على الجدول :

كل أنبوبة اختبار تحتوي ٣ بذور ، والنتيجة مأخوذة من ٥٤ بادرة . الكنترول كلها سليمة ، Pm تعنى  $3 \times 10^3$  جرثومة هدبية من الفطر الممرض أضيفت إلى كل أنبوبة اختبار . Trypticase Soy .  
broth = TSB ، ZmA = المضاد الحيوى الأول .

## العزلتان AF-1 و A13

العزلة A13 ، تعتبر من العزلات المهمة التابعة للبكتيريا *B. subtilis* ، ولها دور مهم فى المقاومة الحيوية . وجد عند معاملة البذور بالعزلة A13 ، تزيد انتاجية كل من الجزر ، الشوفان ، الفول السودانى . تباع هذه العزلة فى السوق لمعاملة بذور الفول السودانى تحت الاسم التجارى Quantum-4000 . يعزى تحسن نمو النبات إلى تثبيط الكائنات الممرضة الرئيسية أو الثانوية ، ويمكن أيضاً أن يرجع إلى التشجيع المباشر لنمو النبات .

أما العزلة AF-1 ، كان أول عزل لها من الخلايا المتحللة للفطر *Sclerotium rolfii* ولقد وجد أنها ذات قدرة تثبيطية فى المعمل لعديد من الكائنات الممرضة النباتية ، وتحسن النمو فى كثير من أنواع النباتات فى التربة المبخرة ببخار الماء الساخن والتربة الطبيعية . إن العزلة AF-1 تعتبر من أهم العزلات التابعة للبكتيريا *B. subtilis* ، ولقد ذكر بأنها تعمل على شكل رايزوبكتيريوم مشجع لنمو النبات يسمى ( ذكرنا ذلك سابقاً فى الفصل الأول ) *PGPR* وكعامل مقاومة حيوية لمقاومة مرض العفن التاجى فى الفول السودانى ، وكذلك تشجع تكوين العقد الجذرية . إن بكترة البذور بالسلالة AF-1 بسبب زيادة مستويات الفينولات الكلية وأنزيمات Lipoxygenase و Peroxidase ، Phenylalanine ammonisa فى البادرات الميكترية ، هذا يدل على إمكانية تدخل المقاومة المستحثة فى النبات العائل فى مقاومة الأمراض التى تستعمل فيها AF-1 . إن مقدرة البكتريا *B. subtilis* على استعمار الجذور باستمرار ، والبقاء حية لمدة طويلة عند إدخالها فى منطقة الرايزوسفير / الرايزوبلين لنبات الفول السودانى ، له أهمية كبيرة ، وذلك لأنها يمكن أن تبقى حية لتكوين لقاح ناجح باستمرار تحت مدى واسع من الظروف .

عند حقن البكتيريا السلالة AF-1 النامية لمدة ست ساعات ، مجتمعة مع الفطر *Aspergillus niger* فى أوقات مختلفة وعلى فترات مختلفة ، لوحظ التصاق الخلايا البكتيرية مع الميسيليوم الفطرى ، وتكاثر الخلايا البكتيرية فى مكانها وتستعمر سطح الميسيليوم . إن نمو السلالة AF-1 يودى إلى تحطيم جدار الخلية ، ويتبع ذلك تحلل الخلية أما حقن السلالة AF-1 فى بيئة محتوية *A. niger* بعد مدة ، صفر ، ٦ و ١٢ ساعة ، فإنه تثبط أكبر من ٩٠ ٪ من النمو الفطرى . أما عند حقنها فى البيئة بعد ١٨ و ٢٠ ساعة من بداية نمو الفطر ، فإن النمو الفطرى يثبط بنسبة ٧٠ ٪ و ٥٦ ٪ بالترتيب إذا قيس بالنسبة للوزن الجاف . أما فى المزارع المزدوجة Dual Culture ، فإن النمو الفطرى لم يكن

متبوعاً بتكوين جراثيم . التحضيرات الميسيليومية من الفطر *A.niger* عند إضافتها كمصدر أولي للكربون ، يدعم نمو البكتيريا *B.subtilis* مثل الزيادة التي تسببها إضافة مادة الشيتين البروتين المستخلص والمرسب من راسح مزرعة *B.subtilis* سلالة *AF-1* له تأثير معنوي في وقت نمو الفطر *A.niger* . أما بذور الفول السوداني المبتكرة بالبكتيريا *AF-1* ، فإنها تظهر إنخفاضاً كبيراً في حدوث مرض عفن التاج المتسبب عن الفطر *A.niger* عند زراعتها في التربة الملوثة بالفطر ، هذا يؤدي إلى القول باحتمال الدور الذي تقوم به هذه البكتيريا في المقاومة الحيوية للفطر *A.niger* .

كما سبق ذكره ، يتأكد لدينا أن العزلة *AF-1* عامل مقاومة حيوية ومشجع لنمو النبات (*PGPR*) ، وهذا ما أيدته *Podil et al* سنة ١٩٩٥ ، وهي تثبط نمو الكائنات الفطرية الممرضة للنبات ، عن طريق إفراز مواد منتشرة ذات تأثير مطهر فطري شبيهة بالمضادات الحيوية. كذلك فإن السلالة *AF-1* عندها المقدرة على خلق مقاومة مستحثة في العائل في بعض أنواع البسلة والفول السوداني ، بالإضافة إلى تشجيع العقد الجذرية في البسلة الهندية. تكون كفاءة المقاومة الحيوية في هذه البكتيريا، عن طريق المواد الشبيهة بالمضادات الحيوية ، أو عن طريق المقاومة المستحثة في النبات . كذلك هناك طريقة أخرى تعتمد عليها هذه البكتيريا في المقاومة الحيوية ، وهي تحليل جدر خلايا الفطر الممرض ، كما يحدث في مقاومة الفطر المسبب للمرض الماحق في القمح . إن مقدرة البكتيريا *AF-1* على استعمار الميسيليوم الفطري وبالتالي تحطيم الجدار الخلوي ، يفسر على أن البكتيريا ترتبط مع السطح الفطري وتتكاثر في الموقع نفسه . تكون حساسية الفطر للبكتيريا عالية كلما صغر عمر المزرعة الفطرية ، وذلك لأن تثبيط نمو الجدار الخلوي يكون سهلاً في الأطوار الأولى من النمو (جدول ٩١) . إن نمو البكتيريا *AF-1* على التحضيرات الميسيليومية للفطر *A.niger* يؤدي إلى القول بأن هذه السلالة عندها القابلية لإنتاج Extracellular proteins (*EP*) والتي تدخل في النمو الفطري . إن تحضيرات *EP* من مزارع *AF-1* النامية على الشيتين توقف نمو الفطر *A.niger* ، وهذا يؤدي إلى القول باحتمال تدخل مادة Chitin *inducible proteins* في عملية وقف نمو الفطر المذكور .

لقد ذكر في مراجع كثيرة ، أن الكائنات الحية الدقيقة القادرة على تحليل الكائنات الأخرى ، تلعب دوراً مهماً في المقاومة الحيوية لأمراض النبات ، هذا التحليل يتم بواسطة عديدة من الإنزيمات ، من بينها الإنزيمات المحللة للشيتين ، وهذا يمكن تطبيقه على

البكتيريا *AF-1* والقول بأنها قادرة على تحليل الشيتين *Chitinolysis* ، وبهذه الطريقة تقوم بدور المقاومة الحيوية الفعال ضد الفطر *A.niger* .

جدول رقم (٩١) : تأثير البكتيريا *AF-1* على نمو الفطر *A.niger* فى المزارع المزروجة السائلة .

| الوزن الجاف ملغ بعد مدة التحضين بالساعات |     |    |     |     | المعاملة      |
|------------------------------------------|-----|----|-----|-----|---------------|
| ٢٤                                       | ١٨  | ١٢ | ٦   | صفر |               |
| ١٤٠                                      | ٩٠  | ٣٠ | ٢٠  | ١٠  | بكتيريا + فطر |
| ٣٠٠                                      | ٢٨٠ | ٢٤ | ٢٢٠ | ٢٠٠ | فطر لوحده     |

ملاحظات على الجدول :

كانت تستعمل البكتيريا بتركيز  $10^6$  وحدة تكوين مستعمرات/مل . أما الفطر فكان يحقن بتركيز ٣٠ جرثومة/مل من البيئة .

### البكتيريا *B.subtilis Cot-1* فى الصوبات الضبابية

الصوبات الزجاجية الضبابية *Fogging glasshouses* ، هى عبارة عن صوبات زجاجية تزود النباتات التى تنمو فيها بالرطوبة العالية باستمرار . تستعمل الآن على نطاق واسع لإحداث تأقلم لوسائل التكاثر الدقيقة والحساسة فى النباتات ، مثل البادرات الناتجة من مزارع الأنسجة أو بادرات أبحاث الهندسة الوراثية . إن فترة ٣ - ٦ أسابيع من الرطوبة العالية، مطلوبة لمنع جفاف مزارع الأنسجة النباتية التى يتكشف منها نظام جذرى ضعيف ذو طبقات شمعية وكيوتكل قليلة ، وثغور غير منتظمة العمل خلال فترة النمو فى المعمل . إن كلا من التشوهات الفسيولوجية ، والظروف البيئية ، تزيد فى قابلية النباتات للإصابة بالكائنات المرضية الفطرية بعد نقلها إلى بيئة الـ *Compost* (مزارع من المواد العضوية المتحللة) . بإستثناء العفن الرمادى المتسبب عن الفطر *B.cinerea* والذى هو مستوطن الصوبات الزجاجية ، فإن دخول الكائنات المرضية *Pythium* ، *Phytophthora* إلى الصوبات الزجاجية الضبابية ، يسبب فقداً كبيراً فى البادرات ، نتيجة الإصابة بمرض سقوط البادرات المتسبب عن الفطرين السابقين ، وهذا يسبب خسائر اقتصادية كبيرة فى شركات إنتاج البادرات ، من المحاصيل المحسنة أو التى تخضع لتجارب الهندسة الوراثية أو مزارع النسيج . كذلك فإن هذين الفطرين يسببان مشاكل كبيرة فى مراقد البذور . إن استعمال

المبيدات الفطرية Prophylactic ثلاث مرات فى الأسبوع ، هى الطريقة الفعالة فى حفظ النباتات ضد الإصابة بالفطريات فى الصوبات الزجاجية الضبابية ، ولكن هذه المبيدات لها مآخذ كبيرة ، مما أدى إلى الاتجاه إلى المقاومة الحيوية .

إن البكتيريا Cot-1 قادرة على منع حدوث مرض سقوط البادرات المتسبب عن كل من *Pythium* و *Phytophthora* فى كثير من النباتات مثل *Hemer-* ، *Photinia* ، *Astilbe* وبادرات الجنس *Brassica* تحت ظروف الرطوبة العالية جداً ، وفى الصوبات الزجاجية الضبابية . بالنسبة لـ *Photinia* فإن كفاءة المقاومة الحيوية ، تكون مشابهة للنتيجة المتحصل عليها من استعمال المبيد الفطرى *Metalaxy* ، عندما يكون تركيز الكائن المضاد المضاف للجذور أكبر من أو يساوى  $3 \times 10^5$  وحدة تكوين مستعمرات / غرام طازج من الجذور (RFW) Root Fresh weight ، ويكون اللقاح الفطرى للكائن الممرض أقل من أو يساوى  $3 \times 10^3$  جرثومة بيضية / غرام بيت . تستعمر البكتيريا *Cot-1* النظام الجذرى المتكشّف فى *Photinia* (micro plants) وبادرات *Brassica* النامية فى البيت *Peat* خلال ٢٨ يوماً فى الحقل فى فترة التأقلم فى الصوبات الزجاجية الضبابية . عند استعمال اللقاح  $4 \times 10^6$  و  $3 \times 10^5$  وحدة تكوين مستعمرات / غرام *RFW* فإن أعداد الجراثيم تبقى بين  $10^5$  و  $10^6$  وحدة تكوين مستعمرات / غرام *RFW* فى المقاطع الأكبر عمراً من النظام الجذرى ، وبين  $10^4$  و  $10^5$  وحدة تكوين مستعمرات على مقاطع قمة الجذر . إن استعمال البكتيريا Cot-1 يثبط قليلاً مرض سقوط البادرات على نبات *Daphne* . إن ظهور المقاومة الضعيفة فى جذور *Daphne* وتثبيط البكتيريا *Cot-1* بواسطة البيئة الميتة لنسج مزرعة *Daphne* يؤدى إلى القول بأن النشاط الضعيف للمقاومة الحيوية ، يكون بسبب انطلاق مركبات مثبّطة بواسطة جذور *Daphne* (جدول رقم ٩٢ ، ٩٣) .

هناك كائنات حية دقيقة مضادة ، تستعمل فى مقاومة الأمراض فى الصوبات الزجاجية

الضبابية ، منها :

- 1 - *Bacillus*
- 2 - *Enterobacter*
- 3 - *Pseudomonas*
- 4 - *Gliocladium*
- 5 - *Pythium*
- 6 - *Trichoderma*

بعض هذه الكائنات تستعمل على نطاق تجارى واسع مثل *B.subtilis* فى القطن وسلالات الفطر *Gliocladium* فى نباتات أخرى . وعلى أية حال فإن توفر هذه الكائنات المضادة يغطى الاحتياجات المطلوبة للوقاية بنسبة كبيرة ويساهم فى وقاية النباتات بصفة تجارية .  
جدول رقم (٩٢) : تأثير استعمال البكتيريا B.subtilis Cot-1 على مرض سقوط البادرات فى بعض النباتات .

| النبات              | % سقوط بادرات بالفطر |         |        | % سقوط بادرات بالفطر   |         |        | % سقوط بادرات من مخلوط فطريات ممرضة عند استعمال |         |        |
|---------------------|----------------------|---------|--------|------------------------|---------|--------|-------------------------------------------------|---------|--------|
|                     | بشيم عند استعمال     |         |        | فايتوفثورا عند استعمال |         |        | فطريات ممرضة عند استعمال                        |         |        |
|                     | مبيد فطرى            | بكتيريا | كنترول | مبيد فطرى              | بكتيريا | كنترول | مبيد فطرى                                       | بكتيريا | كنترول |
| <i>Aster</i>        | ٦                    | ٢       | ٩٦     | ٢                      | ٤       | ١٠٠    | ٧                                               | ١١      | ٩٥     |
| <i>Daphne</i>       | ٤                    | ٦٢      | ٨٦     | ٥                      | ٧٤      | ٩٤     | ٦                                               | ٨٩      | ٩٥     |
| <i>Photinia</i>     | ٤                    | ٧       | ٩٩     | ٦                      | ٣       | ٩٦     | ٣                                               | ٠٧      | ١٠٠    |
| <i>Hemerocallis</i> | ٧                    | ١       | ٩٩     | ٩                      | ٣       | ٧٢     | ٨                                               | ٠٤      | ٩٥     |
| <i>Brassica</i>     | ١                    | ٩       | ٩١     | ٧                      | ٤       | ١٠٠    | ٥                                               | ١٧      | ١٠٠    |

ملاحظات على الجدول : المبيد الفطرى المستعمل Metalaxyl .

الجراثيم البيضاء المستعملة ٢١٠ جرثومة/غم بيت . المخلوط يستعمل فيه ١٠ × ٥ جرثومة بيضية / غرام بيت .

جدول رقم (٩٣) : تأثير تركيز لقاح البكتيريا B.subtilis Cot-1 والفطر *Pythium ultimum* على النسبة المنوية لسقوط البادرات فى نبات *Photinia* .

| المعاملة           | الجرعة | لقاح الفطر <i>Pythium</i> (جرثومة بيضية/غرام بيت) |    |    |    |
|--------------------|--------|---------------------------------------------------|----|----|----|
|                    |        | ١٠                                                | ٢٠ | ٣٠ | ٤٠ |
| مبيد ميتا ليكساييل | ---    | ٦                                                 | ٢  | ٦  | ٣  |
| Cot - 1            | ٩١٠    | ٦                                                 | ٧  | ١٤ | ٦١ |
| Cot - 1            | ٨١٠    | ٢                                                 | ٦  | ٥٤ | ٦٩ |
| Cot - 1            | ٧١٠    | ٢٠                                                | ٧٤ | ٩٧ | ٩٥ |
| Cot - 1            | ٥١٠    | ٩٥                                                | ٩٤ | ٩٦ | ٩٨ |
| كنترول             | ---    | ٩٤                                                | ٩٩ | ٩٦ | ٩٨ |

### III : الجنس Streptomyces

#### مقدمة

تتميز أفراد هذا الجنس ، بأن لها هيفات متفرعة رفيعة دون جدر عرضية ، يتراوح قطرها حوالى ٢٠,٥ ميكرون . عند اكتمال النمو ، يكون الميسيليوم الهوائى سلاسل جراثيم من ثلاثة إلى عدة جراثيم فى كل سلسلة . كذلك فإن أفراد هذا الجنس تكون مستعمراتها على البيئة الغذائية بحجم صغير (١ - ١٠ ملم) فى القطر . تكون المستعمرات فى البداية ذات سطح ناعم إلى حد ما ، ولكن بعد ذلك فإن ما ينتج من الميسيليوم الهوائى ، يمكن أن يظهر المستعمرة بشكل حبيبي أو مسحوقى أو مخملى . تكون الأنواع المتعددة والسلالات المتعددة من هذا الجنس صبغات مختلفة كثيراً ، والتي تلون الميسيليوم والمواد التى تنمو عليها ، وكذلك فهى أيضاً تكون واحداً أو أكثر من المضادات الحيوية التى هى فعالة ضد البكتيريا ، الفطريات ، الطحالب ، البروتوزوا أو الأنسجة المتدنة . كل أنواع هذا الجنس ساكنات تربة ، وموجبة لصبغة غرام .

من ناحية نموذجية ، فإن عامل المقاومة الحيوية ، للكائنات الممرضة ، النباتية الفطرية ، للجذور النباتية ، يجب أن يفرز مواد بكميات كافية ذات نشاط تضادى فى منطقة الرايزوسفير ، وذلك لإحداث خفض معنوى فى أعراض أمراض الجذر . أجريت محاولات كثيرة لتحسين الوراثى لأنواع الجنس *Streptomyces* للحصول على عامل مقاومة حيوية ضد كثير من مسببات الأمراض الفطرية ، وذلك لأن هذا الجنس عنده المقدرة على إفراز مضادات حيوية كبيرة ، ذات مدى واسع التأثير ، كمنتجات تمثيل ثانوية ، بالإضافة لإنزيمات مختلفة ذات تأثير محطم لجدار الخلية الفطرية ، مثل : السليلوز ، شيتينيز ، أمليز ، جلوكاينز ، هيميسليلوز وغيرها .

الدراسات المستفيضة التى أجريت على راسح مزارع الجنس *Streptomyces* لمقاومة أمراض المجموع الخضرى ، أعطت نتائج ، تبين أن حوالى تسعة من عشرة منتجات مختبرة تثبط على الأقل مرضاً واحداً فى الصوبا الزجاجية . لقد ذكر Raddi & Rao أن عزلات من *Streptomyces ambofaciens* كانت قادرة على مقاومة مرض سقوط بادرات الطماطم المتسبب عن الفطر بشيم ، ومرض ذبول الفيوزاريوم فى نباتات القطن فى الأراضى المحقونة صناعياً . هناك تثبيط مماثل لأمراض الجذور قد تم الحصول عليه ، من قبل كثير من

الباحثين وذلك باستعمال الـ *Streptomyces* على شكل جراثيم أو ميسيليوم أو اتحادات من كليهما فى مراقد الإنبات فى الصوبات الزجاجية . ومن الجدير بالذكر أن Rothrock & Gottlieb سنة ١٩٨١ ، ذكروا أن هناك نتائج واضحة تثبت أن مقاومة عفن الجذر الرايزوكتونى فى نباتات البسلة باستعمال *S.hygroscopicus var. geldanus* فى تربة معقمة محقونة صناعياً ، تعتمد على تركيز المضاد الحيوى Geldanamycin (تقارب ٢٠ ميكوغرام / غرام تربة) الذى يفرزه الكائن المضاد المذكور فى التربة . هناك كثير من الدراسات قد أثبتت الأهمية الكمية والتنوعية لأنواع الجنس *Streptomyces* فى منطقة الرايزوسفير ؛ حيث إنها من الممكن أن تعمل كمشجعات نمو نباتية ، بالإضافة إلى استعمار الجذر حتى لو كانت بتركيز ٢١٠ - ١٠<sup>٥</sup> وحدة تكوين مستعمرات من بين السلالات البكتيرية فى منطقة رايزوسفير القمح .

لقد ثبت أن السلالة WYEC-108 التابعة للجنس *Streptomyces lydicus* من أكثر السلالات فعالية وقوة ضد الفطر *Pythium ultimum* فى اختبارات الإطباق . وكما هو معروف فإن أنواع الجنس *Pythium* هى من بين أكثر الممرضات النباتية الكامنة فى التربة التى تسبب عفن البذور والجذر وسقوط البادرات ، قبل وبعد ظهورها فوق سطح التربة على مدى واسع من العوائل .

### طرق فعل الجنس *Streptomyces* فى المقاومة الحيوية :

- ١ - يمكن أن يقوم الجنس *Streptomyces* بتثبيط نمو الجراثيم ، كما فى حالة الفطر *Helminthosporium sativum* ، أو عن طريق تحليل ميسيليوم الفطر الممرض .
- ٢ - عن طريق التطفل على الكائن الممرض .
- ٣ - عن طريق إفراز مضادات حيوية ، حيث إن *Streptomyces cinnamomeus* ، لديه كفاءة عالية فى إنتاج المضادات الحيوية فى المعمل ، وتؤثر على كثير من الفطريات الممرضة للنبات . من أهم هذه المضادات Polyenes ، Cinnamycin ، وهى مركبات عديدة البروتين Polypeptide تنتج بواسطة *S.cinnamomeus f.sp.cinnamomeus* . كذلك فإن المضاد الحيوى Heptanes من أكثر المضادات فعالية حيث تفرزه أنواع أخرى من الجنس نفسه . أما النوع *S.hygroscopicus var geldanus* فإنه ينتج المضاد الحيوى Geldanamycin ذو تأثير فعال ضد عديد من الممرضات النباتية الفطرية .

٤ - يمكن أن يكون التأثير الحيوى عن طريق مواد مضادة متطايرة . ذكر أن هناك بعض الأنواع من هذا الجنس ، تفرز مركبات ذات تأثير مضاد فطرى ، هذه المركبات هي :

1 - Hemipyocianine

2 - Chlororaphin

3 - Phenazine - A

4 - Carboxylic acid

5 - Phenazine - B

### الفطريات التى تقاوم حيويًا باستعمال أنواع الجنس *Streptomyces*

١ - *Fusarium oxysporum f. sp. cubens* على الموز معاملة فسائل . ويقاوم مرض فيوزاريوم على الدخان (جدول ٩٤) .

٢ - *Pythium sp.* مسبب عفن جذور نباتات قصب السكر والذرة ، معاملة عقل و بذور .

٣ - *Rhizoctonia solani* فى المعمل والحقل .

٤ - *Phoma sp.* على كثير من عوائله ، معاملة بذور .

٥ - *Stemphyllium sp.* على كثير من عوائله معاملة بذور .

٦ - كذلك وجد أن غمر البذور أو الجذور أو البادرات فى معلق متجانس من *S.ochracei*

*scleroticus* يقاوم بنجاح ذبول الفيرتسليم فى القطن بنسبة ٧٣,٩ ٪ ، وفى الفلفل

٧١,٤ ٪ ، وفى الباذنجان ٧٤ ٪ ، وذبول فيوزاريوم الطماطم بنسبة ٧٣,١ ٪ ، ذبول

البطيخ ٨٦,٤ ٪ ، ذبول الشامام ٨٥,٧ ٪ ، ذبول الخيار ٩٢,٩ ٪ .

٧ - *Phytophthora sp* فى الفلفل ، يقاوم بنسبة ٧٣,٣ ٪ وفى الطماطم بنسبة

٧١,٤ ٪ .

٨ - ذبول *Colletotrichum sp* فى الباذنجان بنسبة ٧٨,٣ ٪ .

٩ - عفن الجذور المتسبب عن الفطر *R. solani* يقاوم باستعمال *S.hygroscopicus*

*var. geldanus* فى تربة معقمة ، إذا حقنت بالكائن المضاد قبل ساعتين من حقنها

بالفطر الممرض .

١٠- كذلك وجد أن تعفير البذور بأنواع من الجنس *Streptomyces* ، يمنع أو يخفض أمراض عفن الجذور في الصليبيات المتسبب عن *Alternaria brassicola* والفطر *R.solani* . ومن ناحية أخرى وجد أن رش البيت *Peat* بمعلق من أنواع *Strepto-myces* يخفض مرض عفن الجذر في الخيار المتسبب عن الفطر *Pythium* وفي حالات كثيرة يمنع ذبول الفيوزاريوم في القرنفل .

١١- لقد وجد Tahvonen سنة ١٩٨٨ أن استعمال تحضيرات من المسحوق الجاف من أنواع *Streptomyces* بتركيز ٥-١٥ غرام/ $kg^{-1}$  في تعفير البذور و ١,٠-١٠ غرام/ $m^2$  ، فعالة في مقاومة أمراض جذور الخيار وذبول القرنفل . كذلك وجد أن تعفير حيوب القمح والشعير بالتحضيرات المسحوقية من *S.griseovirides* يكون ناجحاً ضد الأمراض ، التي تصيب الجذور والمتسببة عن أنواع فيوزاريوم و *Bipolaris sorokiniana* في تجارب الصوبا الزجاجية ، ووجد أيضاً أن ٣-١٥ غراماً من التحضيرات المسحوقية/كغم بذور تكون فعالة في خفض عفن الجذر ، يبقى التأثير الفعال على البذور المعاملة ثابتاً لمدة ٢-٤ أسابيع عندما تخزن البذور المعاملة في ظروف جافة . يبين (جدول ٩٥) قائمة بالفطريات التي تقاومها أنواع مختلفة من الجنس *Streptomyces* .

### تأثيرات الجنس *streptomyces* على النبات العائل :

إن طرق مقاومة أمراض النبات المختلفة ، بما فيها استعمال عوامل المقاومة الحيوية ، تسبب زيادة في نمو النبات ، هذه الزيادة ، تعزى إلى التأثير المباشر المرافق لمقاومة الكائنات المرضية النباتية .

ذكر كثير من العلماء أن نمو النبات العائل يكون أفضل في غياب الكائنات الحية الدقيقة ، بينما ذكرت مجموعة أخرى من العلماء بأن نمو النبات العائل يكون بالمعدل نفسه سواء في غياب أو وجود الكائنات الحية الدقيقة غير المرضية . في حين أن مجموعة أخرى ذكرت بأن نمو النبات يكون أفضل في وجود الكائنات الحية الدقيقة غير المرضية .

لقد وجد أن بعض نباتات الذرة ، التي تنمو مترافقة مع الفطر *Pythium graminico-* في تربة معاملة بمضادات حيوية غير نقية ، من الجنس *Streptomyces* ، كانت أطول وذات جذور أعمق في التربة ، من تلك النامية في تربة غير معاملة والتي تحتوى

كذلك وجد أن معاملة نباتات الموز بأنواع من الأكتينومايستس مضادة أو ضعيفة التضاد في التربة نفسها التي تنمو فيها النباتات ، تؤدي إلى زيادة كبيرة في النمو أكثر من تلك المعاملة بالأكتينومايستس شديدة التضاد المأخوذة من تربة أخرى . كذلك وجد أن بعض الكائنات المضادة أو راشح مستعمراتها يكون له تأثير سام على النبات ، ويشبط إنبات البذور أو نمو البادرات أو نمو النبات الكامل ، في بعض النباتات .

لقد ذكر Turhan سنة ١٩٨١ أن السلالة 9 - 2 - C من الجنس *Streptomyces* لم يكن لها تأثير ضار على إنبات البذور أو نمو البادرات أو النباتات المعاملة بها ، بل بالعكس فهي تحسن مظهر النبات ويكون إنتاج الثمار أفضل منه في الكنترول . كذلك وجد أن بعض أنواع الجنس *Streptomyces* تخفض حدوث الأضرار لحبوب الشعير وتزيد النمو وتسبب زيادة الوزن الطازج للنباتات الناتجة من بذور غير مصابة بالمرض .

إن استعمال مادة Mycostop وهي تحضير مسحوقى تجارى من الجنس *Streptomyces* ، لا تزيد في إنتاج الشعير فقط ، بل تزيد في إنتاج القمح زيادة معنوية ، وهي تزيد بشكل عام ، إنتاج النجيليات ، الخيار والقرنفل في التجارب الحقلية بنسب تتراوح من ١٠ - ٣٠ ٪ . أما في نباتات الخس زاد الانتاج ٣٠ ٪ وانخفضت الإصابة بالفطر المرض *Botrytis cinerea* بنسبة ٧٠ ٪ ، وانخفضت الإصابة بالفطر *R.solani* بنسبة ٦٠ ٪ . يمكن القول بشكل عام أن التحضيرات المختلفة من الجنس *Streptomyces* المستعملة في المقاومة الحيوية ، عدا عن أنها تقاوم كثيراً من الأمراض الاقتصادية المهمة ، فهي تسبب زيادة أو تحسناً في نمو وإنتاج معظم النباتات التي تعامل بها ، بغض النظر عن النوع البكتيرى المستعمل في المقاومة أو الفطر المرض .

جدول رقم (٩٤) : التأثير البيطى لأنواع من *Streptomyces* النامية على نباتات مختلفة ضد الفطر

. *Fusarium tabacium*

| ملء تثبيط في البيئات الغذائية المختلفة |       |                    |       |            |       | نوع الكائن المضاد |       |                       |
|----------------------------------------|-------|--------------------|-------|------------|-------|-------------------|-------|-----------------------|
| مستخلص السمك                           |       | جلاليسيزول أسبرجين |       | فول الصويا |       |                   |       | نترات + نشا           |
| جافة                                   | سائلة | جافة               | سائلة | جافة       | سائلة | جافة              | سائلة |                       |
| ١٧                                     | ٣٨    | ١٧                 | ٣٥    | ١٣         | ٤٧    | ١٤                | ٣٨    | <i>S.cyanoviridis</i> |
| ١١                                     | ٢٥    | ١٣                 | ٢٨    | ١١         | ٥١    | ١٢                | ٣٢    | <i>S.murinus</i>      |
| ٢١                                     | ٤٦    | ٢٤                 | ٣٥    | ١٢         | ٤٦    | ١٤                | ٣٧    | <i>S.griseoplanus</i> |

جدول رقم (٩٥) : التأثير المنبط لأنواع من *Streptomyces* النامية على بيئة (نشا - نترات) ضد فطريات ممرضة مختلفة .

| التثبيط ملم للكائن الممرض عند استعمال أنواع مختلفة من سترتومايسس |                  |                       | الكائن الممرض                   |
|------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------------|---------------------------------|
| <i>S.griseoplanus</i>                                            | <i>S.murimus</i> | <i>S.cyanovirides</i> |                                 |
| ١٧                                                               | صفر              | ١٢                    | <i>Aspergillus niger</i>        |
| ٢٣                                                               | ١٦               | ٢٠                    | <i>A.Fumigatus</i>              |
| ١٦                                                               | ١٣               | صفر                   | <i>Microsporium gypsiun</i>     |
| ٣٠                                                               | ٢٤               | ٢٨                    | <i>Macrophomina phaseoli</i>    |
| ٣٢                                                               | ١٩               | ٢٦                    | <i>Alternaria alternata</i>     |
| ٣٥                                                               | صفر              | ٢١                    | <i>Drechstera spp</i>           |
| ٢٦                                                               | ١٨               | ١٦                    | <i>Fusarium solani</i>          |
| ١٨                                                               | ١٤               | ١٤                    | <i>F.moniliforme</i>            |
| ٣٧                                                               | ٣٢               | ٣٨                    | <i>F. tabacinum</i>             |
| صفر                                                              | صفر              | صفر                   | <i>Candida albicans</i>         |
| صفر                                                              | صفر              | صفر                   | <i>C.pseudotropicales</i>       |
| صفر                                                              | صفر              | صفر                   | <i>Cryptococcus neoformans</i>  |
| صفر                                                              | صفر              | صفر                   | <i>Trichosporon beigilli</i>    |
| صفر                                                              | صفر              | صفر                   | <i>Saccharomyces cereviseae</i> |

#### كفاءة السلالة WYEC-108 في المقاومة الحيوية لاعفان البذور والجدور

تظهر السلالة WYEC - 108 *Streptomyces lydicus* قوة تضاد في المعمل ، ضد الكائنات الممرضة النباتية الفطرية ، في اختبارات الأطباق ، وذلك عن طريق إنتاج مضادات حيوية خارج الخلية ناتجة عن عمليات الـ Metabolites . عند زراعة كل من *Pythium ultimum* أو *R.solani* في بيئة سائلة مع هذه السلالة ، يلاحظ تثبيط نمو الفطريات . أما عند استعمال جراثيم هذه السلالة أو الميسيليوم المأخوذ منها ، على شكل غلاف لبذور البسلة ، فإن هذا يؤدي إلى حفظ البذور من الإصابة بالفطر *P.ultimum* عند زراعة البسلة في التربة الغنية بالجراثيم البيضية . بينما جميع البذور (١٠٠٪) غير المغلفة بأى أجزاء من تلك السلالة (وسائل المقاومة الحيوية) تصاب بالفطر نفسه خلال ٤٨ ساعة بعد الإنبات ،

أقل من ٣٥ ٪ من البذور المغلفة بوسائل المقاومة الحيوية ظهرت فيها الإصابة. أما عند زراعة البذور المغلفة بوسائل المقاومة الحيوية فى التربة ، قبل إدخال الكائن المرض إليها بمدة ٢٤ ساعة أو بعد إدخال الكائن المرض إليها بمدة ٩٦ ساعة ، فإن أقل من ٢٥ ٪ من البذور النابتة تصبح مصابة (جدولا ٩٦ ، ٩٧) .

الدراسات التى أجريت على مراقد الإنبات، أجريت أيضاً لاختبار التأثير على نمو الإنبات ومقدرة التثبيط التى تظهرها السلالة موضوع الدراسة ، على عفن البذور والجذور المتسبب عن الفطر *Pythium* . عندما تضاف هذه السلالة فى تشكيل يتكون من (جراثيم الكائن المضاد + بيت موص + رمل) بتركيز  $10^8$  وحدة تكوين مستعمرات لكل غرام إلى تربة غير معقمة أو تربة معقمة ومحقونة بالفطر المرض *P.ultimum* المزروعة ببذور البسلة أو القطن، أن هناك زيادة معنوية فى متوسط عدد النباتات السليمة ، وفى طول ووزن النبات فى كلتا الحالتين ، بالمقارنة مع نباتات الكنترول غير المعاملة والمزروعة فى أراضٍ مماثلة (جدول ٩٩) .

أثبتت الدراسات الحقلية أن هيفات أفراد السلالة *WYEC-108* عندها القدرة على الاستعمار والانتقال إلى أسفل مع الجذر كلما استطال . تحتاج هذه السلالة لفترة أطول من ٣٠ يوماً حتى يمكن للتجمعات البكتيرية أن تستعمر الجذور المستطيلة الناتجة عن البذور النابتة ، وتبقى ثابتة على تركيز  $10^6$  وحدة تكوين مستعمرات/غرام فى منطقة الرايزوسفير ، بينما تنخفض التجمعات فى غير منطقة الرايزوسفير لهذه السلالة على الأقل بنسبة ١٠٠ ضعف (من  $10^6$  إلى  $10^3$ ) أو أقل وحدة تكوين مستعمرات/غرام . جدول ٩٨ .

إن نبات تجمعات السلالة *WYEC-108* المحضنة على حرارة ٢٥ م فى تلك التشكيلات أو فى تربة معقمة أو غير معقمة لم يمكن تحديدها . فى الظروف الثلاثة فإن تجمعات السلالة المذكورة تبقى ثابتة فى حجمها لمدة ٩٠ يوماً أو أكثر . عند وضع بذور كل من البسلة ، القطن ، والذرة السكرية فى تربة غير معقمة أو معقمة محتوية  $10^6$  وحدة تكوين مستعمرات أو أكثر من السلالة نفسها/غرام ، فإنها تستعمر الجذور المستطيلة . بعد فترة نمو تصل أسبوع واحد فإن تجمعات هذه السلالة ذات تركيز  $10^6$  وحدة تكوين مستعمرات/غرام وزن رطب من الجذور ، وجدت أنها لا تزال على جذور البسلة فى التربة المعقمة المعاملة ، وفى الظروف المعاكسة  $10^4$  وحدة تكوين مستعمرات/غرام وجدت فى التربة غير المعقمة المعاملة .

أجريت دراسات أخرى على التفاعل فى المعمل بين السلالة المذكورة والفطر

*P. ultimum* ، حيث مزجت ميسيليومات السلالة المذكورة مع الجراثيم البيضية للفطر المذكور ، في الآجار ، والذي بعدئذ استعمل على شكل غشاء لتغليف شريحة overslips . بعد ستة ساعات من تخضين هذه المستحضرات في أوعية الصبغ Staining jars على حرارة ٢٥ م ، يحدث تفاعل مباشر بين الكائنات الحية الدقيقة ، يمكن ملاحظته بالميكروسكوب الإلكتروني . أظهرت النتائج أن السلالة WYEC-108 كانت قادرة ، ليس فقط ، على تحطيم الجراثيم البيضية النابتة للفطر *P. ultimum* ، ولكنها أيضاً قادرة على تحطيم جدر خلايا الهيفات الفطرية . تظهر هذه النتائج أن هذه السلالة ذات كفاءة عالية في المقاومة الحيوية ، يمكن استعمالها في مقاومة أمراض عفن الجذور والبذور المتسببة عن جنس *Pythium* .

جدول رقم (٩٦) : تأثير معاملة بذور البسلة والقطن بالسلالة WYEC-108 من البكتيريا سترتومايسز، على مرض عفن البذور ، سقوط البادرات ، الطول ، الوزن الطازج ، لنباتات البسلة والقطن المزروعة في تربة محقونة صناعياً بالفطر *P. ultimum* سلالة P-8 .

| قطن                |               | بسلة           |                    | المعاملة |               |                                               |
|--------------------|---------------|----------------|--------------------|----------|---------------|-----------------------------------------------|
| غ وزن النبات الرطب | سم طول النبات | % نباتات مريضة | غ وزن النبات الرطب |          | سم طول النبات | % نباتات مريضة                                |
| ---                | ---           | ---            | ---                | ---      | ---           | تربة معقمة                                    |
| ١٣٣                | ١٨,٨          | ١٧,٥           | ٨٩                 | ١٨,١     | ١٤,٣          | كنترول (دون أى إضافات)                        |
| ١٩                 | ٣,٥٧          | ٩٢,٩           | ٠,٩                | ١,١٤     | ٨٥,٧          | تركيز منخفض من الفطر الممرض                   |
| ١                  | ٠,٣           | ٩٦,٤           | ٠,٣                | ٠,٢٩     | ٩٦,٤          | تركيز مرتفع من الفطر الممرض                   |
| ٧١                 | ١٣,٨          | ٤٦,٤           | ٩٨                 | ١١,٦     | ٢٨,٥          | تركيز منخفض من الفطر + سلالة البكتيريا        |
| ٧٨                 | ١٦,٤          | ٣٥,٧           | ١٢٩                | ١٣,٣     | ٣٥,٧          | تركيز مرتفع من الفطر + سلالة البكتيريا        |
| ٧٩                 | ١٧,٣          | ٧,١٥           | ١٥٠                | ١٩       | ٨,٢٦          | كنترول (سلالة البكتيريا)                      |
| ---                | ---           | ---            | ---                | ---      | ---           | تربة غير معقمة                                |
| ٩٦                 | ١٩,٧          | ٨,٢٥           | ٧٣                 | ١٦       | ٢١,٤          | كنترول (دون أى إضافات)                        |
| ١٧                 | ٣,٨٧          | ٨,٤٧           | ٢٦                 | ٣,٥٨     | ٦٧,٨          | تركيز منخفض من الفطر الممرض                   |
| ١٢                 | ١,٨٢          | ٩٦,٤           | ١٢                 | ٠,٧٤     | ٧٨,٦          | تركيز مرتفع من الفطر الممرض                   |
| ٦٤                 | ١٢,٨          | ٣٢,١           | ٦٥                 | ١٠,١     | ٣٢,١          | تركيز منخفض من الفطر الممرض + سلالة البكتيريا |
| ٤١                 | ٨,٣٧          | ٣٩,٢           | ٤٤                 | ٧,٦٥     | ٤٦,٦          | تركيز مرتفع من الفطر الممرض + سلالة البكتيريا |
| ٦٢                 | ١٦,٦          | ٢١,٤           | ٩٢                 | ١٨,٩     | ٨,٤٦          | كنترول (سلالة البكتيريا)                      |

## ملاحظات على الجدول :

التركيز المنخفض من الفطر الممرض = التربة معاملة بنسبة ١٤ جرثومة بيضية/مل . التركيز المرتفع من الفطر = التربة معاملة بنسبة ٥٠٠ جرثومة بيضية/مل . النباتات المريضة = تشمل عفن البذور وسقوط البادرات بعد وقبل ظهورها فوق سطح التربة . السلالة البكتيرية تضاف بتركيز  $10^8$  وحدة تكوين مستعمرات/غرام تربة .

جدول رقم (٩٧) : الاستعمال الأولى للسلالة WYEC-108 على جذور البسلة ، القطن والذرة في تربة معقمة وغير معقمة .

| متوسط العدد من وحدات تكوين مستعمرات/غم وزن رطب من الجذر SD |                                      |                                      | نوع التربة |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------|
| الذرة السكرية                                              | القطن                                | البسلة                               |            |
| $310 \times 3,75 \pm 310 \times 6,77$                      | $410 \times 2,74 \pm 10 \times 2,47$ | $10 \times 2,22 \pm 10 \times 3,01$  | معقمة      |
| $310 \times 1,5 \pm 310 \times 3$                          | $310 \times 4 \pm 10 \times 5,2$     | $410 \times 6,29 \pm 10 \times 9,78$ | غير معقمة  |

## ملاحظات على الجدول :

كان يؤخذ المتوسط من خمس عينات . عند الزراعة كانت تجمعات WYEC-108 =  $1 \times 10^7$  في التربة المعقمة و  $1,6 \times 10^6$  وحدة تكوين مستعمرات / غرام تربة غير معقمة . كانت تؤخذ عينات الجذور بعد سبعة أيام من الإنبات .

جدول رقم (٩٨) : التضاد الحيوى فى المعمل الذى تظهره السلالة WYEC-108 .

| القدرة على الحياة بعد خمسة أيام | التضاد بعد |       | البيئة الغذائية | الكائن الممرض                      |
|---------------------------------|------------|-------|-----------------|------------------------------------|
|                                 | ٥ يوم      | ٢ يوم |                 |                                    |
| -                               | +++        | +++   | PDA             | <i>Pythium ultimum wheat I</i>     |
| -                               | +++        | +++   | PDA             | <i>P.ultimum P8</i>                |
| -                               | +++        | +++   | PDA             | <i>P.ultimum P9</i>                |
| -                               | +++        | +     | CMA             | <i>Aphanomyces euteiches Bob-F</i> |
| -                               | +++        | ++    | CMA             | <i>A.euteiches A6</i>              |
| +                               | ++         | -     | PDA             | <i>Fusarium oxysporum</i>          |
| +                               | +          | -     | PDA             | <i>F.solani f.sp.pisi</i>          |
| +                               | ++         | -     | PDA             | <i>F.solani f.sp. psis F6</i>      |
| +                               | ++         | +     | PDA             | <i>Rhizoctonia solani</i>          |
| +                               | ++         | +     | V-8A            | <i>R.solani R4</i>                 |
| +                               | ++         | +     | PDA             | <i>Phymatotrichum omnivorum</i>    |

ملاحظات على الجدول :

دليل التضاد +++ تعنى أكبر من ٢ سم ، ++ تعنى أقل من ٢ سم وأكبر من ١ سم + تعنى أصغر من ١ سم وأكبر من نصف سم ، (-) تعنى أقل من نصف سم .  
دليل القدرة على البقاء - تعنى دون نمو ، + تعنى نمو .

CMA = مجروش الذرة + آجار . V-8A = عصير طماطم + آجار ، ٢٥٠ غرام عصير طماطم + ٢,٥ غرام كربونات كالمسيوم توضع فى آلة الطرد المركزى على ٣٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ١٥ دقيقة ثم يؤخذ العائم ليكمل إلى لتر من بيئة V-8A

جدول رقم (٩٩) : مقدره السلالة WYEC-108 على تثبيط النمو الميسيليومى للفطر الممرض فى بيئة سائلة مع مصادر مختلفة من السكر كمصدر للكربون .

| متوسط الوزن الجاف (ملغ) $\pm$ SD من الفطريات الممرضة |        |                      |        |                      |        | نوع السكر فى البيئة |
|------------------------------------------------------|--------|----------------------|--------|----------------------|--------|---------------------|
| <i>R.solani</i> x 5 Fs                               |        | <i>P.ultimum</i> P9  |        | <i>P.ultimum</i> P8  |        |                     |
| + سلالة<br>البكتيريا                                 | كنترول | + سلالة<br>البكتيريا | كنترول | + سلالة<br>البكتيريا | كنترول |                     |
| ٣٠,٤                                                 | ٣٤,٥   | ٢٢                   | ٤٠     | ١٩,٥                 | ٢٩     | بدون سكر مضاف       |
| ١٩,٥                                                 | ٢٧,٦   | ١٩,٩                 | ٢٨,٣   | ١٨                   | ٤٠,٦   | جلوكوز              |
| ٢٤,٩                                                 | ٤٤,١   | ١١,٨                 | ٣٩,٦   | ١٦,٣                 | ٢٦,٤   | سوربوز - ل          |
| ٤٠,٥                                                 | ٣٨     | ٣١,٦                 | ٢٢,٥   | ٢٨,٢                 | ٢٨,٤   | سكروز               |

## IV : السلالة K-1026 من الجنس *Agrobacterium* المهندسة وراثياً ودورها في مقاومة مرض التدرن التاجي

### مقدمة

يعتبر مرض التدرن التاجي Crown gall من الأمراض واسعة الانتشار عالمياً ، ويتسبب عن أنواع من الجنس *Agrobacterium* ، وهو المسئول عن الخسائر التي تحدث في المشاتل وفي الحقول بين كثير من أنواع النباتات . إن المقاومة الحيوية الناجحة لمرض التدرن التاجي باستعمال السلالة غير الممرضة K84 من الجنس أجروبيكتيريم ، قد طبقت عملياً على مستوى تجارى لمدة ٣٠ سنة تقريباً . مع أن هناك استعمال عالمي لهذه البكتيريا ، إلا أن هناك أعداداً من الأبحاث أثبتت أن هناك أخطاراً كبيرة وأثراً ضاراً غير متوقعة نتيجة استعمالها . مع كل ذلك ، فإن نظام المقاومة الحيوية باستعمال السلالة K84 ، قد يكون أحياناً أكثر العوامل الحيوية المتوفرة حالياً نجاحاً لمقاومة أمراض التدرن التاجي البكتيرية في النباتات . وعلى أية حال فإن الجيل الثانى من السلالة K84 قد تم الحصول عليه بالمهندسة الوراثية ، وذلك للحصول على المقاومة الحيوية الآمنة للتدرن التاجي . هذه السلالة كانت تسمى K-1026 وأصبحت أول كائن حى دقيق مهندس (GEM) مسجل ، ليكون مصرح له كمبيد آفات يستعمل تجارياً . هناك أعداداً كثيرة من الدراسات قد أنجزت لمقارنة K-1026 مع أبويها السلالة K-84 ، ولكن لغاية سنة ٢٠٠٠ لا تزال المعلومات المتوفرة والمكتوبة عن هذه السلالة تحتاج إلى توضيح أكثر .

### مرض التدرن التاجي Crown Gall Disease

يتسبب مرض التدرن التاجي عن أنواع مختلفة من الجنس أجروبيكتيريم ، منها biovar *A.tumefaciens* ، *A.rhizogenes* و *A.vitis* ، كانت تسمى سابقاً أنواع حيوية biovar رقم ١ ، ٢ ، ٣ للجنس أجروبيكتيريم ، هذه الأنواع تهاجم مدى واسع من المحاصيل . هناك أكثر من ٦٠٠ نوع عوائلى موصوف لهذا الجنس ، ولكن الأمراض التي ذكرت على أنها هامة اقتصادياً ، تعتبر أعداد قليلة ، منها تلك التي تهاجم أشجار الفاكهة (اللوز ، التفاح ، الكمثرى ، المشمش ، الكرز ، الخوخ ، البرقوق) ، الجوزيات مثل (الجوز ، البيكان) والعنبيات مثل (عنب الثعلب وعنب الذيب والعنب) وأعداد كثيرة من ثنائية الفلقة منها بعض نباتات الزينة مثل الورد والأقحوان .

لم تحدد الخسائر الاقتصادية في الانتاج ، نتيجة لهذه الأمراض ، تحديداً دقيقاً ، ولكن أجرى حصراً في الثمانينيات في أسبانيا ، دل على أن ٧٠ ٪ من المشاتل قد هوجمت بمرض التدرون التاجي ، أما عن حدوث المرض فقد وصل إلى نسبة ٩٠ ٪ من النباتات التي هوجمت بالكائن الممرض . يؤثر المرض تأثيراً كبيراً على نوعية المادة المهاجمة أو المصابة ، كذلك فإن المرض يمكن أن يسبب أضراراً للمحاصيل النامية . تكون الخسارة الاقتصادية محصورة أساساً ، في المشاتل ، حيث أن النباتات المتورمة (المتدرة) يجب أن تقلع وتجري إبادتها .

تعتبر أنواع الجنس أجروبيكتيريم من البكتيريا ساكنة التربة ، والتي تحدث إصابتها عن طريق الجروح فقط ، أو عن طريق العدسيات ، وتستحث خلايا النبات لتتكاثر على شكل ورم . يتم الحصول على هذا الورم عن طريق نقل قطعة منفصلة من الـ DNA البكتيري (تسمى T-DNA) إلى أنوية خلايا النبات ، حيث تتحكم في الانتاج العالي لهرمونات النمو النباتية (الأكسينات والسايوكاينينات) وبناء المركبات الغريبة الجديدة المسماة Opines . يتواجد الـ T-DNA على سلالات الـ tumorigenic للجنس أجروبيكتيريم في بلازميدز كبيرة ، تسمى البلازميدات المخلقة للوزم (Ti) . كما ذكر Kerr سنة ١٩٩١ فإن تخليق التدرون التاجي يشمل خطوات عديدة منها :

- ١ - الانجذاب الكيماوي للبكتيريا . يكون ناتجاً عن بعض المركبات الفينولية المفرزة من الأنسجة المجروحة .
- ٢ - التصاق وتثبيت البكتيريا مع خلايا النبات .
- ٣ - حث جينات الشدة المرضية بواسطة مركبات الفينولات النباتية .
- ٤ - عملية الـ T-DNA والتي تنقل قطعة منفصلة من DNA البكتيريا إلى خلية النبات .
- ٥ - دمج الـ T-DNA في جينوم النبات .
- ٦ - بناء T-DNA يشفر لهرمونات النباتية .
- ٧ - سرعة إنقسام خلية النبات لتكون ورم .
- ٨ - بناء Opines .

تكون هذه العملية متنوعة بنمو مميز للجنس أجروبيكتيريم ، بسبب استخدام الـ Opines والنقل المحتمل لبلازميد Ti إلى خلايا بكتيرية أخرى مستحثة بواسطة Opines .

## صفات السلالة K84

كان اكتشاف السلالة K84 ، نتيجة للملاحظة قوية وحاذقة في الحقل ، وذلك عندما لاحظ New & Kerr سنة ١٩٧٢ أن معدل وجود الأفراد الممرضة إلى غير الممرضة من البكتيريا أجروبيكتيريم كان مرتبطاً تماماً بحدوث التدرن التاجي على غراس اللوز . عندئذ قاموا بمحاولات لتحديد فيما إذا كانت زيادة أعداد الكائنات غير الممرضة على الجذور يمكن أن تثبط تكوين الورم بواسطة الكائن الممرض . ثم بعد ذلك ، توالت الأبحاث لمعرفة علاقة الأفراد غير الممرضة مع الأفراد الممرضة .

عزلت السلالة K84 في استراليا ، من تربة قد تم الحصول عليها ، من منطقة محيطة بورم في ساق الخوخ ، وعندما حقنت هذه السلالة في غراس الخوخ لم يظهر على هذه الغراس أورام ، عندئذ تم معرفة تأثير هذه السلالة على السلالة الممرضة . عند عزل السلالة الممرضة وحقنها ثانية مع السلالة K84 في النبات بنسبة ١ : ١ ، لم يتكون تدرن تاجي على النبات .

لقد صنفت السلالة K84 على أنها *A. radiobacter* ولقد استمر هذا التصنيف معمولاً به من ذلك الوقت ، مبنياً على أن هذه السلالة غير ممرضة وتتبع biovar رقم ٢ من الجنس *Agrobacterium* . اعتماداً على التقسيم والتصنيف الحديث للجنس أجروبيكتيريم ، فإن السلالة K84 يجب أن تسمى *A. rhizogenes* ، إلا أن هذا التصنيف لأنواع الجنس أجروبيكتيريم لم يعتمد من قبل كثير من الباحثين .

تحتوى السلالة K84 على ثلاثة بلازميدات طبيعية هي :

1 - pAgK 434 (pAtk 84 a ويسمى أيضاً

وهو أكبر من 300kd ويعمل تشفير لانتاج الأجروسان 434 .

2 - pNoc (pAtK84 b ويسمى أيضاً

ويعمل تشفير لـ Catabolism of nopaline وهو يساوى 173 kb

3 - pAgK 84

وهذا يساوى 47.7 kd والذي يشفر لانتاج ومناعة للأجروسان 84 .

ونظراً لأن pNoc يمتلك مساحات كبيرة التناظر (أكثر من ٥٠٪) مع بلازميد Ti من السلالة C58 للبكتيريا *A. tumefaciens* ، افترض أن pNoc يمكن أن يكون انتاج مهمل من البلازميد نوع 58 pTiC والذي قد تم تعطيل فعاليته فى T-DNA ومناطق *vir* والذي يؤدي إلى فقد فى الـ oncogenicity .

### المقاومة الحيوية باستعمال السلالة K84

إن أكثر الطرق نجاحاً (إلى حد بعيد) فى منع مرض التدرن التاجى ، يتم باستعمال السلالة K84 ، وهناك عدة تقارير قد أظهرت كفاءة K84 فى مقاومة مرض التدرن التاجى فى عوائل مختلفة ، وبلدان مختلفة فى معظم أنحاء العالم . إن ما أظهرته التجارب الأولية باستعمال هذه السلالة فى المقاومة الحيوية ، كان عبارة عن انتاج مضاد حيوى عالى التخصص للاجروبيكتيريم يسمى Agrocin 84 هذا المضاد تركيبه di-substituted ، fraudulent adenine nucleoside analogue والذي هو فعال ضد بعض سلالات ممرضة من أنواع الجنس أجروبيكتيريم .

تقاوم السلالة K84 بنجاح السلالات التى تكون حساسة للأجروسين 84 ، حيث أن انتاج مثل هذا المضاد الحيوى يكون مطلوباً للمقاومة الفعالة . وعلى أية حال فإنه تحت الظروف الحقلية فإن السلالة K84 يمكن أيضاً أن تقاوم الكائنات الممرضة التى تكون مقاومة للأجروسين 84 . لم يحدد الميكائزم المستعمل بواسطة السلالة K84 لمقاومة الكائنات الممرضة المقاومة للأجروسين 84 (لم يحدد تماماً) ولكن المعلومات المتوفرة الآن (٢٠٠١) ، تدل على أن المقاومة الحيوية المتحصل عليها بهذا العامل ظاهرة معقدة . إن انتاج الأجروسين 84 يبدو أنه واحداً فقط من الصفات الداخلة فى هذه العملية .

تنتج السلالة K84 مادة ثانية مضادة للجنس أجروبيكتيريم تسمى أجروسين 434 ، والتى هى أقل تثبيطاً من أجروسين 84 فى المعمل . هذا الأجروسين والذي غالباً ما يكون تركيبه الكيماوى di-substituted cytidine nucleoside ، يثبط فقط سلالة 2 biovar من الجنس أجروبيكتيريم (يسمى الآن *A. rhizogenes*) . إذن فإن الأجروسين 434 يمكن أن يلعب دوراً فى المقاومة الحيوية للكائنات الممرضة الحساسة لـ 434 من Biovar 2 . كذلك أيضاً فإن K84 تنتج مادة ثالثة شبيهة بالمضاد الحيوى ، تسمى 84 ALS والذي يثبط فى المعمل عدة نيرموجنك من سلالات أجروبيكتيريم . إن نشاط التثبيط للمادة 84 ALS يكون

متعلقاً مع انتاج السايذروفورز بواسطة K84 تحت ظروف كمية حديد محدودة . إن التركيب الكيماوى والدور الفعال الذى يقوم به ALS 84 فى المقاومة الحيوية للتدرن التاجى بواسطة السلالة K84 لا يزال غير محدد حتى الآن (يوليو ٢٠٠٠) .

### اسباب فشل المقاومة الحيوية بالسلالة K84

بالرغم من النجاح الذى حققته K84 فى المقاومة الحيوية ، إلا أن هذا النجاح كان محدوداً وأحياناً معكوساً ، أي لا يسبب مقاومة وإنما يسبب مرض . هذا يعنى أن هناك بعض المشاكل المحتملة يمكن أن تكون مترافقة مع استعمالها فى المقاومة الحيوية . معظم الأبحاث التى ذكرت الفشل (أبحاث قليلة) لم تكن قد وضحت هذا الفشل ، بسبب عدم توفر معلومات عن السلالات المعزولة من النباتات المتورمة المعاملة بالسلالة K84 . يمكن أن يكون الفشل نابعاً عن وجود تجمعات كبيرة من الكائنات الممرضة المقاومة للأجروسين 84 ، أو الاصابات المتأخرة ، وجود الأجيرويكثيريم على شكل كائن ممرض داخلى Endophytic ، تشكيلات مع أعداد منخفضة من خلايا K84 الحية ، تركيزات منخفضة من K84 على الجذور مقارنة مع لقاح الكائن الممرض فى التربة ، معاملة اللقاح معاملة غير مناسبة ، مدة البقاء القصيرة (حياة) لـ K84 فى التربة ، وجود تضاد حيوى أو منافسات على استعمار الجذر ... الخ . زيادة على ذلك فمن الضرورى أن نلاحظ أن تجارب المقاومة الحيوية يجب أن تجرى فى ظروف تشابه الظروف الطبيعية من حيث الاصابة والمعاملات حتى يبدو كأنها ممثلة للكفاءة الحقيقية للسلالة K84 . تجارب الحقن المختلط لمعاملة السيقان أو الجذور بمخلوط من الكائن الممرض وعامل المقاومة الحيوية ، لا تكون ملائمة ، وذلك لأنها لا تستطيع أن توجد ظروف مشابهة لتلك التى تكون متوفرة للسلالة K84 عند استعمالها فى الطبيعة .

هناك سبب آخر للفشل ، متعلق بانتقال البلازم (وهو مشروح فيما بعد بالتفصيل) . لقد ذكر العالم Panagopoulos *et al* سنة ١٩٧٩ ، أن هناك فشل للسلالة K84 فى تجارب الحقل ، وذلك عندما كانت K84 والكائن الممرض الحساس للأجروسين 84 محقونين معاً على جذور شتلات اللوز ، كانت الكائنات الممرضة المقاومة للأجروسين 84 بعد ذلك تعزل من الأورام الكثيرة التى تكشفت ، ومن بينها عزلات عديدة كانت أيضاً تنتج أجروسين 84 .

ما يستنتج من هذه المعلومات هو أن الجينات المنظمة لانتاج أجروسين 84 والحساسية له كانت منقولة من السلالة K84 إلى مستقبل ممرض ، مودياً إلى تحطيم تجارب المقاومة الحيوية هذه ، وذلك لأنه بعد مثل هذا الانتقال يصبح المستقبل الممرض مقاوم للأجروسين 84 . فى ذلك الوقت كان الجين pAgK 84 يمكن نقله أيضاً فى المعمل من K84 إلى مستقبل أجروبيكتيريا . إن حدوث واقعة النقل هذه فى تجارب المقاومة الحيوية كان من المحتمل بسبب (يعود جزئياً) إلى التجمعات الكثيفة العالية من كل من الكائن الممرض وعامل المقاومة الحيوية والذى كل منهما يدخل صناعياً . بالرغم من ذلك فإن هذه النتائج أثارَت السؤال الآتى وهو فيما إذا كان مثل هذا التحطيم يمكن أن يحدث خلال التجارب الطبيعية للمقاومة الحيوية مستعملة K84 فى الحقل . ذكر فى هذا المجال أن نقل الجين 84 PAgk من السلالة K84 إلى *A.tumefaciens* يمكن أيضاً أن يحدث فى عديد من تجارب المقاومة الحيوية ، والذى فيها معاملات حقن التربة والنبات تشابه كثيراً الظروف السائدة عندما تكون المقاومة الحيوية ناجحة فى المشاتل . زيادة على ذلك فإن العالم Lu ذكر سنة ١٩٩٤ أنه يمكن إعادة اكتشاف عديداً من العزلات الممرضة من أجروبيكتيريم المعزولة محتوية pAgK84 ، من التدرنات الموجودة على النباتات المعاملة مسبقاً بالسلالة K84 ونامية فى المشاتل التجارية فى الولايات المتحدة . كذلك فإن *Stockwell et al* سنة ١٩٩٦ ذكر الاكتشاف الحقلى للنقل التزاوجى *transconjugants* للسلالة الممرضة الناتجة من تجارب الحقن المشترك على الكرز .

تشير جميع هذه التقارير إلى حدوث التكرار النسبى لانتقال pAgK84 خلال الاستعمال العملي للسلالة K84 ، هذا يمكن أن يخفض بشكل كبير جداً كفاءتها فى المقاومة الحيوية ، بسبب أن النقل التزاوجى *Transconjugants* يكون منتجات أجروسين 84 ومقاومة للمضاد الحيوى . زيادة على ذلك فإن تجارب المقاومة الحيوية التى تستعمل مثل هذا النقل التزاوجى لمثل الكائن الممرض المستعمل فى الحقن ، تدل على أنها لم تقاوم بواسطة K84 واقترح بأنها كانت مهددة كفاءة K84 فى مدة قصيرة أو متوسطة . لمنع مثل هذا الانتقال وحراسة المقاومة الحيوية للتدرن التاجى من التحطم بسبب النقل التزاوجى للجين 84 pAgK من K84 إلى سلالة أجروبيكتيريم الممرضة K1026 مخفية pAgK84 التى ينقصها نقل المشتقات ( $Tra^-$ ) قد تم دراستها والتغلب عليها .

## سلالة الكائن الحي الدقيق المهندسة وراثياً K1026

الكائن الحي الدقيق المهندس وراثياً (GEM) Genetically engineered microorganism ، لقد تم الحصول على السلالة K1026 بعد نجاح التعاون بين فريق الباحثين الاستراليين والباحثين الأمريكيين في شمال أمريكا ، الذين اشتركوا في اكتشاف وتحديد صفات السلالة K84 ، عندما كانوا يبحثون في الصفات البيولوجية لبلازميدات الجنس أجروبيكتيريم . وقد تم وضع خرائط لـ pAgK84 وعرفت محددات النقل التزاوجي (Tra region) بواسطة مخلق الطفرات Transposon mutagenesis ، وباستعمال دراسات وراثية معقدة وطرق حديثة في الهندسة الوراثية ، أمكن الحصول على سلالة ناتجة من الهندسة الجينية لكل من K84 و pAgK1026 وسميت هذه السلالة باسم K1026 .

### فعالية السلالة K1026 في المقاومة الحيوية

يوجد في جدول رقم ١٠٠ مقارنة لفعالية السلالة K84 و K1026 في الوضع الطبيعي (ليس المعملي) ضد سلالات أجروبيكتيريم الحساسة والمقاومة للأجروسين 84 . تظهر هذه التجارب بشكل واضح أن كفاءة السلالة K1026 مشابهة تماماً لكفاءة السلالة K84 في مقاومة التدرن التاجي ، تحت ظروف مختلفة وعوائل مختلفة ومناطق مختلفة (بلدان ومقاطعات) . تقاوم كلتا السلالتين التدرن التاجي حتى تحت إصابة شديدة للمرض . كذلك فإن كلتا السلالتين لديها قدرة على مقاومة المرض المتسبب عن كل من الكائنات الممرضة الحساسة للأجروسين 84 والمقاومة له . كذلك فإن هذه التجارب تظهر أن السلالة K1026 عندها القدرة أيضاً على استعمال ميكائزيمز أخرى ليس لها علاقة مع الحساسية للأجروسين 84 بنفس السلوك كما في سلالة K84 . نظراً للقيود المحددة لاستعمال GEM المطلق في كثير من الأقطار ، فإن النتائج المتوفرة عن مقارنة فعالية المقاومة الحيوية في الظروف الحقلية الحرة ، هي فقط تلك المأخوذة من تونس والولايات المتحدة حيث أن كلتا السلالتين أظهرت نفس النتائج .

بالإضافة لذلك ، هناك أربعة مشاتل تجارية كبيرة في أستراليا قد زودت الباحثين بتصاريح عن فعالية السلالة K1026 في مقاومة مرض التدرن التاجي في أعداد من العوائل النباتية ، قد تبين في بعض من هذه المشاتل بأن السلالة K1026 لانزال في الاستعمال لمدة تزيد عن عشرة سنوات . يمكن الاستنتاج من هذه المعلومات بأن السلالة المذكورة K1026

تستطيع أن تقاوم معنوياً مرض التدرن التاجي (significantly) الناتج من الإصابة الطبيعية في المشتل أو الحقل حيث يكون حدوث المرض ، عادة ، أقل من ذلك الناتج عن اللقاحات الصناعية بالكائن المرض .

#### انتقال بلازمم أجروسين 84

لقد تمت دراسات عديدة لتحديد امكانية انتقال وتكرار هذا الانتقال ، لبلازمم أجروسين 84 من السلالات K84 و K1026 إلى مستقبلات من الجنس أجروبيكتيرم ، في عديد من تجارب المقاومة الحيوية ، على عوائل نباتية مختلفة (مثل هجين الخوخ × اللوز ، الورد ، الصفصاف) . في عدد أربعة من عشرة من التجارب التي أجريت حديثاً ، تبين أن pAgK84 كان قد انتقل من K84 إلى المستقبل في الكائن المرض في أنسجة التدرن التاجي من نباتات متورمة معاملة بالسلالة K84 ، ولكن لم يظهر في أى من التجارب أن انتقال pAgK1026 أو اكتشف في التدرنات من نباتات معاملة بالسلالة K1026 . لقد اكتشف انتقال pAg K84 في تدرنات عوائل كل من تهجين خوخ × لوز GF677 ، الصفصاف والورد .

تدل هذه المعلومات على أن هناك احتمالات عالية ومتكررة لانتقال pAgK84 من K84 وكذلك تدل على غياب هذا الانتقال التزاوجي عند استعمال السلالة K1026 للمقاومة الحيوية لمرض التدرن التاجي في ظروف مشابهة للظروف الطبيعية .

جدول رقم (١٠٠) : مقارنة بين السلالة K84 والسلالة K1026 من حيث كفاءتها في المقاومة الحيوية .

| Country   | Host          | Challenge pathogen | Susceptibility to agrocinn 84 | Treatment | Number of analyzed plants | % of plants with galls | Index of biocontrol efficiency <sup>a</sup> |
|-----------|---------------|--------------------|-------------------------------|-----------|---------------------------|------------------------|---------------------------------------------|
| Australia | Young almonds | K27                | Susceptible                   | Untreated | 12                        | 100                    |                                             |
|           |               |                    |                               | K84       | 14                        | 14                     | 86                                          |
|           |               |                    |                               | K1026     | 12                        | 25                     | 75                                          |
|           | Old almonds   | K27                | Susceptible                   | Untreated | 15                        | 100                    |                                             |
|           |               |                    |                               | K84       | 15                        | 20                     | 80                                          |
|           |               |                    |                               | K1026     | 15                        | 27                     | 73                                          |
| Jordan    | Tomato        | B4                 | Susceptible                   | Untreated | 12                        | 75                     |                                             |
|           |               |                    |                               | K84       | 12                        | 0                      | 100                                         |
|           |               |                    |                               | K1026     | 12                        | 0                      | 100                                         |

| Country | Host                          | Challenge pathogen | Susceptibility to agrotin 84 | Treatment | Number of analyzed plants | % of plants with galls | Index of biocontrol efficiency <sup>a</sup> |
|---------|-------------------------------|--------------------|------------------------------|-----------|---------------------------|------------------------|---------------------------------------------|
| Spain   | Hybrid peach x almond GF677   | 8301               | Susceptible                  | Untreated | 12                        | 83                     |                                             |
|         |                               |                    |                              | K84       | 12                        | 0                      | 100                                         |
|         |                               |                    |                              | K1026     | 12                        | 0                      | 100                                         |
|         |                               | B1                 | Resistant                    | Untreated | 12                        | 67                     |                                             |
|         |                               |                    |                              | K84       | 12                        | 0                      | 100                                         |
|         |                               |                    |                              | K1026     | 12                        | 0                      | 100                                         |
|         | Hybrid peach x almond Adafuel | 804-42             | Susceptible                  | Untreated | 110                       | 3                      |                                             |
|         |                               |                    |                              | K84       | 110                       | 0                      | 100                                         |
|         |                               |                    |                              | K1026     | 110                       | 0                      | 100                                         |
|         |                               | 805-3              | Susceptible                  | Untreated | 110                       | 13                     |                                             |
|         |                               |                    |                              | K84       | 110                       | 0                      | 100                                         |
|         |                               |                    |                              | K1026     | 110                       | 1                      | 92                                          |
|         | Hybrid peach x almond GF677   | 804-42             | Susceptible                  | Untreated | 110                       | 21                     |                                             |
|         |                               |                    |                              | K84       | 110                       | 1                      | 95                                          |
|         |                               |                    |                              | K1026     | 110                       | 0                      | 100                                         |
| 805-3   |                               | Susceptible        | Untreated                    | 110       | 71                        |                        |                                             |
|         |                               |                    | K84                          | 110       | 0                         | 100                    |                                             |
|         |                               |                    | K1026                        | 110       | 1                         | 99                     |                                             |
| Spain   | Hybrid peach x almond GF677   | 678-2              | Resistant                    | Untreated | 50                        | 50                     |                                             |
|         |                               |                    |                              | K84       | 50                        | 17                     | 66                                          |
|         |                               |                    |                              | K1026     | 50                        | 0                      | 100                                         |
|         |                               | 436-3              | Resistant                    | Untreated | 50                        | 19                     |                                             |
|         |                               |                    |                              | K84       | 50                        | 0                      | 100                                         |
|         |                               |                    |                              | K1026     | 50                        | 0                      | 100                                         |
| Spain   | Hybrid peach x almond GF677   | 325-4              | Susceptible                  | Untreated | 78                        | 69                     |                                             |
|         |                               |                    |                              | K84       | 85                        | 6                      | 91                                          |
|         |                               |                    |                              | K1026     | 99                        | 1                      | 96                                          |
| Spain   | Hybrid peach x almond GF677   | 325-4              | Susceptible                  | Untreated | 61                        | 91                     |                                             |
|         |                               |                    |                              | K84       | 50                        | 4                      | 96                                          |
|         |                               |                    |                              | K1026     | 57                        | 7                      | 92                                          |
| Spain   | Hybrid peach x almond GF677   | B6                 | Resistant                    | Untreated | 76                        | 9                      |                                             |
|         |                               |                    |                              | K84       | 56                        | 0                      | 100                                         |
|         |                               |                    |                              | K1026     | 70                        | 0                      | 100                                         |
|         |                               | 66R                | Resistant                    | Untreated | 66                        | 18                     |                                             |
|         |                               |                    |                              | K84       | 80                        | 0                      | 100                                         |
|         |                               |                    |                              | K1026     | 61                        | 2                      | 89                                          |

| Country | Host                    | Challenge pathogen | Susceptibility to agrocin 84 | Treatment | Number of analyzed plants | % of plants with galls | Index of biocontrol efficiency <sup>a</sup> |
|---------|-------------------------|--------------------|------------------------------|-----------|---------------------------|------------------------|---------------------------------------------|
| Spain   | Cherry Camil            | 678-2              | Resistant                    | Untreated | 41                        | 66                     |                                             |
|         |                         |                    |                              | K84       | 38                        | 8                      | 88                                          |
|         |                         |                    |                              | K1026     | 39                        | 8                      | 88                                          |
|         | Cherry Colt             | 678-2              | Resistant                    | Untreated | 57                        | 54                     |                                             |
|         |                         |                    |                              | K84       | 57                        | 7                      | 87                                          |
|         |                         |                    |                              | K1026     | 57                        | 5                      | 90                                          |
|         | Cherry 'Damil'          | 678-2              | Resistant                    | Untreated | 52                        | 8                      |                                             |
|         |                         |                    |                              | K84       | 28                        | 0                      | 100                                         |
|         |                         |                    |                              | K1026     | 32                        | 0                      | 100                                         |
|         | Cherry 'F12.1'          | 678-2              | Resistant                    | Untreated | 39                        | 85                     |                                             |
|         |                         |                    |                              | K84       | 20                        | 30                     | 65                                          |
|         |                         |                    |                              | K1026     | 22                        | 14                     | 84                                          |
|         | Cherry 'Inmil'          | 678-2              | Resistant                    | Untreated | 65                        | 19                     |                                             |
|         |                         |                    |                              | K84       | 46                        | 4                      | 77                                          |
|         |                         |                    |                              | K1026     | 39                        | 3                      | 86                                          |
| Tunisia | Sour almond             | Natural infection  | Untreated                    | 47        | 100                       |                        |                                             |
|         |                         |                    | K84                          | 59        | 3                         | 97                     |                                             |
|         |                         |                    | K1026                        | 117       | 3                         | 97                     |                                             |
| USA     | Apple                   | n.a. <sup>b</sup>  | n.a.                         | Untreated | 125                       | 7                      |                                             |
|         |                         |                    |                              | K84       | 125                       | 2                      | 71                                          |
|         |                         |                    |                              | K1026     | 125                       | 0                      | 100                                         |
|         | Apricot/Peach           | n.a.               | n.a.                         | Untreated | 125                       | 17                     |                                             |
|         |                         |                    |                              | K84       | 125                       | 1                      | 94                                          |
|         |                         |                    |                              | K1026     | 125                       | 0                      | 100                                         |
|         | Pear                    | n.a.               | n.a.                         | Untreated | 125                       | 10                     |                                             |
|         |                         |                    |                              | K84       | 125                       | 1                      | 90                                          |
|         |                         |                    |                              | K1026     | 125                       | 0                      | 100                                         |
|         | <i>Prunus tomentosa</i> | n.a.               | n.a.                         | Untreated | 125                       | 9                      |                                             |
|         |                         |                    |                              | K84       | 125                       | 0                      | 100                                         |
|         |                         |                    |                              | K1026     | 125                       | 0                      | 100                                         |
| Walnut  | n.a.                    | n.a.               | Untreated                    | 125       | 7                         |                        |                                             |
|         |                         |                    | K84                          | 125       | 0                         | 100                    |                                             |
|         |                         |                    | K1026                        | 125       | 0                         | 100                    |                                             |

ملاحظات : دليل المقاومة الحيوية للتدرن الثاني =  $100 - (\% \text{ من المرض الحادث في التجربة } \times 100)$

مقسوماً على  $(\% \text{ من المرض الحادث في الكنترول})$ . هذه المعادلة حسب ما ذكره Penyalver and

lopez سنة 1999 . n.a. = غير متوفر .

## انتاج المضادات الحيوية بواسطة السلالة K1026

## أجروسين 84 . 434 و ALS 84

إن انتاج السلالة K1026 للأجروسين 84 ، يدل على أن pAgK1026 يحتفظ بمراكز البناء الحيوى للأجروسين 84 من pAgK84 . زيادة على ذلك فإن كميات الأجروسين 84 المنتجة بواسطة السلالة K1026 تكون مشابهة لتلك المنتجة بواسطة K84 . هذا يؤدي إلى القول بأن pAgK1026 يحتفظ بعدة نسخ من جده الأعلى pAgK84 ، وأن ليس هناك محددات لثبات البلازميد قد حذفت . كذلك فإن السلالة K1026 تنتج أجروسين 434 ، إلى حد ما ، كما هو الحال في السلالة K84 ، نظراً لأن انتاج هذا الأجروسين يكون مشفر له على pAgK434 والذي هو موجود في كلتا السلالتين . كذلك فإن ALS84 ينتج أيضاً بواسطة السلالة K1026 بنفس الكمية المنتجة بواسطة السلالة K84 ، نظراً لأن انتاجه يبدو أنه مشفر له كروموسمياً (هذه أبحاث *Penyalver et al* سنة ٢٠٠٠) .

## استعمار الجذر والبقاء في الرايزوسفير بواسطة السلالة K1026

كما هو معروف ، فإنه يجب أن ينمو عامل المقاومة الحيوية ويستمر وجوده على سطح النبات الذي يستعمل لوقايته . إن الاستعمار والبقاء في منطقة الرايزوسفير ، قد تأكد بشكل كبير ، بأنه من الأمور الأساسية للمقاومة الحيوية للكائنات الممرضة الكامنة في التربة .

لقد ثبت بأن K84 عامل استعمار جيد للجهاز الجذري لكثير من العوائل النباتية المختلفة . ومن المعقول افتراض أن كفاءة السلالة K84 لاستعمار جذور النباتات المعاملة بها، هو عامل مهم مطلوب لنجاح المقاومة الحيوية لمرض التدرن التاجي . في هذا المجال فإن مستويات استعمار جذور غراس الخوخ بواسطة السلالة K84 و K1026 كان متشابهاً . هذا يدل على أن K1026 كانت جيدة في الاستعمار كما هو الحال في السلالة K84 ، على الأقل ، خلال فترة الثلاثة أسابيع التي أجريت فيها التجربة .

كذلك فقد أمكن استرجاع السلالة K1026 من الجذور بعد سبعة شهور من حقنها في شتلات اللوز . زيادة على ذلك ، فإن دراسات المقارنة على مقدرة السلالة K84 والسلالة K1026 للبقاء حية في الرايزوسفير ، قد أظهرت بأن كلتا السلالتين تبقى حية على مستويات تقارب  $10^6$  وحدة تكوين مستعمرات لكل غرام من الجذر ، بعد ثمانية شهور من حقنها على الجذور في النباتات الناتجة من نهجين (خوخ × لوز GF677) .

بالاختصار يمكن القول بأن شطب الجين *tra* من pAgK84 في السلالة K84 لانتاج K1026 لا يؤثر في مقدرتها على استعمار الجذور وبقاءها حية في منطقة الرايزوسفير .

### مناقشة الاسباب المحتملة لفشل المقاومة الحيوية بالسلالة K1026

يمكن أن تفشل المقاومة الحيوية للتدرن التاجي عن طريق نقل بلازميد Ti من الجنس أجروبيكتيرم الممرض كمعطى إلى السلالة K84 كمستقبل ، والتي عندئذ تصبح ممرضة ، بالرغم من احتفاظها بالمقدرة على انتاج الأجروسين 84 والمناعة . إن الجين pNoc من السلالة K84 الذى ينتمى إلى المجموعة غير المتوافقة (Inc Rh1) كما فى بلازميد Ti نوع nopaline ، وأن وجوده فى السلالة K84 ، قد أعتقد بأنه أمان للمقاومة الحيوية عن طريق منع أكتساب بلازميد Ti. حتى البلازميدات غير المتوافقة، تكون غير قادرة على التضاعف فى نفس الخلية ، مثل هذه الوقاية من الممكن أن لا تكون فعاليتها كما هو متوقع منها . لقد ذكر Stockwell *et al* سنة ١٩٩٠ أن Transposon - tagged لبلازميد Ti ، قد تم نقله إلى السلالة K84 بعد الحقن المشترك للبكتيريا *A.tumefaciens* و K84 فى سيقان الطماطم ، ولكن ولا أى من صفات الانتقال التزاوجى قد تم إنجازها . زيادة على ذلك فقد ذكر وصف للانتقال الذاتى للبلازميد Ti من *A.tumefaciens* إلى السلالة K84 فى نسج التدرن التاجي . هذا الانتقال اكتشف مرة واحدة فقط فى واحد من أورام تجربة مقاومة حيوية .

أظهرت تجارب التهجين أن إعادة الاتحاد بين بلازميد Ti وجين pNoc ، يمكن حدوثها فى K84 ، مؤدية إلى تكوين بلازميد Ti جديد . إن التكرار الذى به يمكن لبلازميد Ti أن ينتقل تزاوجياً إلى السلالة K84 فى الحقل وكيفية إنعكاسه أو تأثيره على كفاءة المقاومة الحيوية لا تزال غير معروفة (٢٠٠٠) . إن صفات نواجى الانتقال التزاوجى شديد المرضية المشتقة من K84 المتحصل عليها فى دراسات كثيرة قورنت مع سلوك النوع الأصلى للبكتيريا *A.tumefaciens* المعطى لبلازميد Ti . إن كلاً من المدى العوائلى ، المقدرة على تخليق أورام فى كثير من الأشجار المثمرة ، وثبات المحددات المرضية فى عزلات من الأورام لم تختلف بين تلك السلالتين . وعلى أية حال فإن الانتقال التزاوجى لم يكن مسيطراً عليه بواسطة K84 واستمر حياً فى نظام الجذر على كثافة تجمعات عالية أكبر منه فى بلازميد Ti السلالة المعطية النوع الأصلى . وبالتالي فإن ظهور وامكانية التواجد فى التربة للسلالات

الحاملة بلازميد Ti في K84 قد وصف من قبل العالم Vicedo *et al* سنة ١٩٩٦ ، ولكن يبدو أنها حادثة غير متكررة .

يمكن التأكيد بأن المقاومة الحيوية لمرض التدرن التاجي باستعمال سلالة K1026 ناجحة بنسبة ١٠٠ ٪ إلا إذا كانت هذه السلالة قادرة على أن تكتسب بلازميد Ti (وتصبح ممرضة) وهذا التوقع أو الافتراض غير ممكن الحدوث أبداً ، وذلك لأن انتقال بلازميد Ti من السلالات المختلفة من البكتيريا *A.tumefaciens* إلى السلالة K1026 لم يحدث أبداً في أية تجربة أجريت على المقاومة الحيوية باستعمال السلالة K1026 .

### الاستعمال التجارى للسلالة K1026

تحضر السلالة K84 وتباع تجارياً بواسطة عديد من الشركات ، على أشكال مختلفة من التحضيرات . يمكن أن تحضر على الشكل الآتى :

تجهز مزارع بكتيرية على أطباق بترى (أطباق آجار) ، تجفف خلايا البكتيريا بالتجميد ، يعمل منها تشكيلات على شكل كرات صغيرة مكونة من مجموعة من الخلايا البكتيرية مغلفة بمادة كاربوكسى ميثايل سليلوز ثم تغلف بعد ذلك بمادة البيت Peat الناعمة جداً ، وبالتالي يصبح التحضير مثل تحضير بكتيريا العقد الجذرية *Rhizobium* . هناك أشكال وحوامل مختلفة تحضر عليها البكتيريا K84 وذلك حسب الشركات المنتجة ، وهى الآن متوفرة بكميات كافية لجميع الطلبات . وقد راعت الشركات مدة التخزين وطريقة الاستعمال كمنتج تجارى فعال للمقاومة الحيوية .

أما بالنسبة للسلالة الجديدة K1026 التى غطت فى استعمالها على استعمال السلالة السابقة K84 وكادت تلغيها الان (٢٠٠١) ، فهى تحضر بنفس الطريقة وتباع الان فى الأسواق بشكل تجارى محمولة على البيت Peat .

سجلت السلالة K1026 كميبيد حيوى Biopesticide فى أستراليا فى نهاية ١٩٨٨ ، وأصبحت أول كائن حى مهندس وراثياً GEM يستعمل تجارياً ويعرض للججمهور . يباع المنتج التجارى تحت اسم NOGALL (بدون أورام) بواسطة شركة Bio-Care فى أستراليا . ينتج هذا المحضر على شكل تركيبات محمولة على البيت Peat تحتوى على الأقل ١٠<sup>٩</sup> بكتيرية فى الغرام الواحد ، ذات سقف حياة يصل ستة شهور . انتشر استعمال هذا المبيد الآن فى الأسواق الأمريكية .

المعلومات المتوفرة حالياً ، تدعم تسجيل واستعمال السلالة K1026 (والتي هي GEM) كمبيد حيوى للمقاومة الحيوية لمرض التدرن التاجى ، وذلك لأنها فعالة تحت ظروف مختلفة ، عوائل مختلفة ، أقطار وبلدان مختلفة . كذلك ، نظراً لأن استعمالها لا يشكل أية خطورة لا للكائنات الحية الدقيقة ولا للبيئة . إذن يجب أن تستعمل السلالة K1026 حيث كانت السلالة K84 تستعمل وذلك فى المقاومة الحيوية الآمنة لمرض التدرن التاجى .

### الآمان Safety

كل الدراسات التى أجريت على سمية K84 واستعمالها العالمى الواسع ، لمدة ثلاثون سنة ، أثبتت بما لم يدع مجالاً للشك أن هذه السلالة غير ضارة للنبات ، الحيوان وكذلك الإنسان . أما السلالة K1026 فهى كما سبق وذكرنا أنها GEM وأن جميع الأبحاث التى أجريت عليها لغاية يوليو ٢٠٠٠ أثبتت بأنها لا تزال غير ضارة لهذه الكائنات الحية (النبات - الحيوان - الإنسان) وكذلك غير ضارة للبيئة . من الملاحظات الهامة الواجب ذكرها هي الآتى :

١ - إن السلالة K84 هي الجد الأعلى للسلالة K1026 قد سجلت على أنها مبيد حيوى biopesticide وقد استعملت تجارياً فى أقطار عديدة حيث لم يذكر فى هذه الأقطار أية أضرار تسببها هذه السلالة .

٢ - إن السلالة K1026 ماثلة تماماً Identical للسلالة K84 باستثناء إفتقارها إلى جزء 5.9kb من بلازميد 84 الأجروسين ، وبالتالي تكون مانعة لانتقال بلازميد 84 الأجروسين . لا يوجد بقايا غريبة للـ DNA فى السلالة (GEM K1026) .

٣ - السلالة K1026 لا تحتوى على جينات مشفرة لبلازميد Ti داخلية فى تخليق مرض التدرن التاجى .

٤ - السلالة K1026 هي Biovar 2-strain من الجنس أجروبيكتيريم ولا تستطيع النمو على حرارة ٣٧ م (درجة حرارة جسم الإنسان). أما الكائنات الدقيقة الشبيهة بـ *A. radiobacter* ، تصبح ذات تأثير ضار متزايد على الإنسان عند هذه الدرجة من الحرارة ، ولكن هذه السلالات الطيبة تظهر تحمل لدرجات حرارة أعلى ويمكن أن تنمو على حرارة ٣٥ م ، بينما السلالة K1026 لا تستطيع ذلك .

٥ - الأجروسين 84 المنتج بواسطة K1026 و K84 يكون متخصص لأنواع البكتيريا الممرضة للنبات والتي تتبع الجنس أجروبيكتيريم . أما الكائنات الدقيقة الأخرى لا تتأثر به . وبالتالي لا يكون هناك أضراراً للبيئة من استعمال الأجروسينات 84 ، 434 و ALS 84 عند استعمال K84 أو K1026 ، كذلك لم يثبت أية أضرار من هذه المواد عند انتاجها من السلالة K1026 .

### كلمة مختصرة عن الموضوع :

السلالة K84 من الجنس أجروبيكتيريم كانت تسمى سابقاً *A. radiobacter* ، استعملت بنجاح كعامل مقاومة حيوية لمقاومة مرض التدرن التاجي لمدة ٣٠ سنة في جميع أنحاء العالم . بالرغم من كفاءتها العالية ، إلا أن لها خطراً مهماً يحدث أحياناً ، حيث أنها يمكن أن تفشل في المقاومة الحيوية للمرض وتصبح نفسها ممرضة . هذا الفشل يكون راجعاً إلى انتقال البلازميد pAgK84 إلى السلالات من الجنس نفسه . هذا البلازميد يعمل تشفير لانتاج الأجروسين 84 والمناعة ضده وهو العامل الرئيسي في المقاومة الحيوية لمرض التدرن التاجي بواسطة السلالة K84 . أمكن الحصول على الجيل الثاني من السلالة K84 وأجرى عليه الهندسة الوراثية وحصل على سلالة تسمى K1026 ، هذه السلالة تحتوي على فقرة مشطوبة في منطقة نقل 84 pAgK وهي التي تتحكم في عدم تحول هذه السلالة من كونها عامل مقاوم إلى عامل ممرض .

## V : جنس البكتيريا *Pantoea agglomerans*

### الاسم القديم *Erwinia herbicola*

يستعمل هذا الجنس من البكتيريا في المقاومة الحيوية لكثير من أمراض النبات الفطرية والبكتيرية منها :

١ - معاملة حبوب القمح بهذه البكتيريا يقيها من الإصابة بالأمراض الآتية :

1 - *Fusarium culmorum*

2 - *F. nivale*

3 - *Pythium ultimum*.

4 - *R. solani*. مسبب لفحة الغمد في القمح

5 - *Puccinia recondita f. sp. tritici*.

6 - *Pseudomonas syringae pv. syringae*.

7 - *Verticillium dahliae* البكتيريا المعزولة من الأجسام الحجرية للفطر

٢ - في الطماطم تقاوم الإصابة بالفطر *Alternaria solani* .

٣ - في الفاصوليا تقاوم الإصابة بالفطر *Sclerotinia sclerotiorum*

٤ - في وقاية بذور القطن من الإصابة بالبكتيريا

*Xanthomonas campestris pv. malvacearum*

٥ - في وقاية الأرز من إصابة البادرات بالبكتيريا *Xanthomonas oryzae*

٦ - في وقاية الفاصوليا الهندية من الإصابة *X. campestris pv. vignaeradiatae*

٧ - في وقاية التفاح من الإصابة بمرض اللفحة النارية المتسبب عن

*Erwinia amylovera*