الفصل السادس

أهم أجناس الكائنات الحية الدقيقة المستعملة في المقاومة الحيوية

أولاً: الأجنـــاس الفطـــرية

I: الجنـــس *Trichoderma*

مقـــدمة

لقد ذكر الجنس *Trichoderma* منذ أكثر من مائة عام، وذلك من قبل العالم Persoon. يتكون هذا الجنس من مجموعة فطريات مترادفة الأسماء، تعزل من التربة ومن المواد العضوية المتحللة. عزلات هذا الفطر شائعة الانتشار، ومن السهولة عزلها وتربيتها في بيئة غذائية. بالإضافة لذلك فإن هذه العزلات تنمو بسرعة على كثير من المواد الغذائية المختلفة، وتنتج مضادات حيوية تكون نتيجة التمثيل الغذائي، كذلك 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 التي 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 في 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 الى تسعة أنواع، حددت على أساس الصفات المورفولوجية، إلا أن العالم Bisset سنة ١٩٩١ أعاد دراسة الجنس *Trichoderma* وأضاف اليه بعض Hypocrea ذات الأشكال المتقاربة، وأدى ذلك الى تقسيم هذا الجنس إلى خمسة مجموعات، وبالتالى فإن مفهوم الأنواع ضمن هذا الجنس واسع جداً، وهذا أدى إلى تقسيم الأنواع الى Specific وآخر Subspecific (هذا ما ذكره Samuels سنة ١٩٩٦).

من أكثر أنواع الجنس *Trichoderma* تحديداً ومعرفة، هى :-

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، فى حين أن النوع الثانى والرابع تلائمهما التربة ذات الحرارة المنخفضة، أما النوع الأول يتواجد فى المناطق الدافئة، أما النوع الثالث والسادس فإنهما يتواجدان فى ظروف المناخ المتقلب.

كفاءة الجنس في المقاومة الحيوية

١- معاملـــة تربـــة

قبل سنة ١٩٧٠ أجريت دراسات كثيرة على المقاومة الحيوية، وذلك باستعمال الجنس *Trichoderma* على التربة، وذلك لإحداث تغيرات فى التجمعات الطبيعية للكائنات الحية فى التربة أو فى الأجزاء النباتية المحيطة بها التربة، مما يؤدى إلى المقاومة الحيوية. لقد ذكر Bliss سنة ١٩٥١ أن مقاومة الفطر *Armillaria mellea* فى الحمضيات بعد التبخير بمادة ثانى كبريت الكربون، تعزى الى التجمعات الطبيعية للفطر *Trichodema* التى تنتشر بسرعة فى التربة المعقمة، ولكنه لم يضع تفسيراً لذلك، لأن هذه التجمعات تكون هى السبب فى مقاومة الكائن الممرض. ولقد ذكر أن الفطر *Trichoderma*، أكثر مقاومة لمادة ميثايل بروميد 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 فى تفهم المقاومة الحيوية.

بدأت المقاومة الحيوية التطبيقية فى الحقل باستعمال الفطر *Trichoderma* بواسطة العالم *Well et al.* سنة ١٩٨٢، وذلك باستعمال تحضيرات من الفطر تريكوديرما النامى على بيئة صلبة (حبوب، شيلم أو قمح) وذلك للمقاومة الحقلية للفطر الممرض *Sclerotium rolf-sii* على نباتات الطماطم. هذا النظام من المقاومة يحتاج كميات كبيرة من المواد العضوية لينمو عليها الفطر المضاد (٤٢٠٠ كغم/ هكتار) لمقاومة المرض. إلا أن العالم Kabana استطاع أن يستعمل بعض المواد الحبيبية غير الذائبة (الدياتومات) المخلوطة مع المولاس لتنمية الفطر المضاد *T.harzianum*، ثم تؤخذ هذه الحبيبات وتضاف على خطوط التربة المزروعة بالفول السودانى، وهذا يحتاج ١١٢- ١٤٠ كغم/ هكتار، تنثر هذه المواد بعد الزراعة بحوالى ٧٠- ١٠٠ يوم، وهذا يؤدى الى مقاومة ناجحة للفطر *S.rolfsii* وأدى الى زيادة إنتاج الفول السودانى 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 الى التربة مع الفطر المضاد *T.harzianum* تشجع نمو الفطر الممرض *Pythium* وتساعد فى زيادة استعمار المواد العضوية، وهذا يؤدى 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 شتلات الفراولة قبل زراعتها فى الأرض الدائمة، وهذا يؤدى إلى خفض حدوث الأمراض لهذه الشتلات. كذلك تم الحصول على مقاومة ممتازة لذبول الفيوزاريوم فى الاقحوان سنة ١٩٨٤، وذلك بإضافة مزيج من العلق المائى للجراثيم الكونيدية للفطر *T.viride* مع المبيد الفطرى البنليت، حيث إن هذا البيوتايب الفطرى مقاوم للمبيد بنليت. تستعمل جراثيم الفطر المضاد بتركيز $^{٤}١٠$ 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 Papavizas سنة ١٩٨٤، أن التحضيرات الفطرية الناتجة من التخمرات بكميات كبيرة Fermen- (FB) tor Biomass والتى على شكل مسحوق وطين او 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 ال *(FB)* من فطريات *T.viride* و *T.harzianum* و*T.hamatum*، تقلل وتثبط بقاء ونمو الفطر الممرض *R.solani*، فى التربة وتخفض مرض عفن ثمار الطماطم الناتج عن رايزوكتونيا.

٢- معاملة بذور

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

لقد تم الحصول على مقاومة حيوية جيدة لسقوط البادرات المفاجئ فى 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 الاشعة الفوق بنفسجية من الفطر *T.harzianum* و *T.viride*. وكذلك حصل تحسن كبير فى نمو النباتات وزيادة إنتاج فول الصويا المزروع فى 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 للقطن لمقاومة *R.solani* أعطى نتيجة جيدة فى الحقل فى إسرائيل.

هناك بعض الملاحظات يجب مراعاتها عند استعمال الجنس *Trichoderma* كمعاملة بذور، وهى:

١ – يجب أن يكون الفطر قادراً على التكاثر فى التربة.

٢ – يجب أن يكون الفطر ذا مقدرة على التنافس فى منطقة الرايزوسفير، وذلك لتثبيط الكائن الممرض بالمنافسة أو بالتطفل الفطرى او التضاد الحيوى.

٣ – يجب أن يكون الفطر ذا تضاد حيوى وله القدرة على التجمع وتكوين مستعمرات فى منطقة الرايزوسفير والسبيرموسفير.

٤ – يجب ألا يكون حساساً للسايدروفورز المفرزة من البكتيريا والكائنات الدقيقة الأخرى فى التربة.

٥ – يمكن تحسين كفاءة هذا الجنس عن طريق التنقية والاختيار والهندسة الوراثية والتربية.

٣ - الاستعمال على المجموع الخضري

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

من الأمثلة الأكثر نجاحا فى المقاومة الحيوية باستعمال الجنس *Trichoderma* على الاجزاء الخضرية فى 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*، الاسم القديم *Chondrostereum* 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 الممرض يحمى شجرة البرقوق ذات عمر سنتين، تماما من المرض، ولكن لايعطى النتيجة نفسها اذا استعمل الكائن المضاد مع الكائن الممرض في الوقت نفسه.

لا يقتصر استعمال الفطر *Trichoderma* على منع المرض فقط، ولكن أيضا يمكن أن تكون هناك معاملات علاجية لمقاومة مرض الورقة الفضية باستعمال الفطر *T.viride*، حيث يستعمل على اوتاد خشبية ٠,٨ x ١٠ سم توضع فى حفر على مسافات ١٠ سم فى جذع والأفرع الرئيسية لشجرة البرقوق المصابة بمرض الورقة الفضية، أو الخوخ أو أشجار الذكترين. استعملت هذه الطريقة فى أوائل السبعينيات واعطت نتائج كالآتى:

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

٣٣٪ لم تعط أية أعراض.

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 تجاريا فى فرنسا وبريطانيا. وبحلول ١٩٨١ كان هناك أكثر من عشرين الف شجرة مثمرة قد عوملت تجاريا بالفطريات المذكورة.

لم يقتصر استعمال الجنس *Trichoderma* على الجروح فقط، وانما استعمله Tronsomo 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 اول 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 للازهار بالكائن الممرض وليس عند حدوث المرض من الحقن الطبيعى. إن قلة 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 ٩° م، بينما الفطر الممرض *B.cinerea*، يمكن أن يعيش ويهاجم النبات على حرارة أقل من ٩° م. أما بالنسبة للفطر *T.harzianum*، وجد أن رش جراثيمه الكونيدية على أزهار التفاح يخفض 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 فى الحقل تعتمد على درجة الحرارة وعلى تركيز اللقاح المستعمل من الجراثيم الكونيدية.

المضادات الحيوية التي يكونها الجنس *Trichoderma*

يبين شكل رقم ٧ المضادات الحيوية التى يكونها الفطر *Trichoderma* spp.

رقم ١ : Trichodermol ويفرزه الفطر *T. polysporum*

رقم ٢ : Harzianum ويفرزه الفطر *T. harzianum*

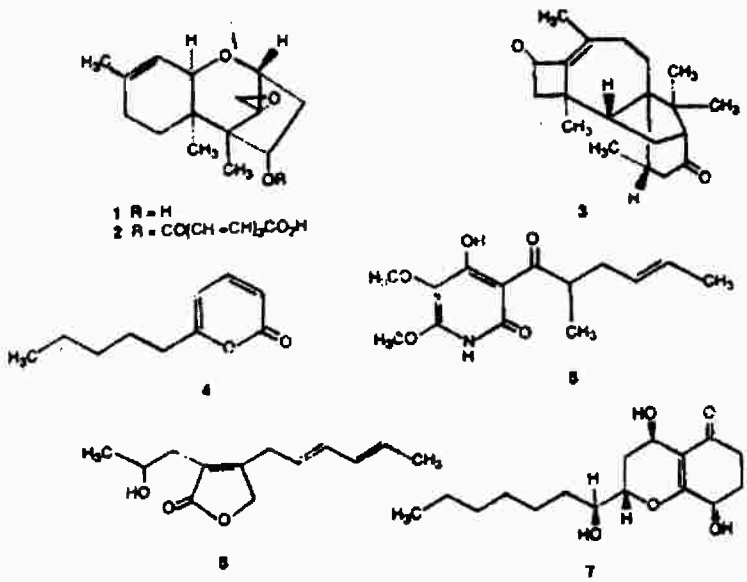
رقم ٣ : Harziandione ويفرزه الفطر *T. harzianum* strain *1*

رقم ٤ : 6 - pentyl - 2- pyrone، يفرزه الفطر *T. harzianum* السلالة المعروفة باسم (IMI275950). وجد أن هذا المركب فعال بتركيز ١٠ أجزاء فى المليون ضد الفطر *R.solani* والفطر مسبب المرض الماحق فى 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

٦ – harzianolide ، Butenolide ويفرزه *T.harzianum* تحت ظروف معينة .

٧ – Polyketides ويفرزه الفطر *T. harzianum* تحت ظروف معينة .



شكل رقم (٧) : التركيب الكيماوى للمضادات الحيوية التى يفرزها الفطر.

Trichoderma spp.

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

Trichoderma harzianum
ودوره في المقاومة الحيوية

مقـــدمة

يعتبر النوع *harzianum* من أهم الأنواع التابعة للجنس *Trichoderma* المستعمل فى المقاومة الحيوية لأمراض النبات. يعتبر هذا النوع بأنه نوع متكتل Species aggregate والذى يحوى وفرة كبيرة من السلالات، التى يمكن أن تستعمل كعوامل مقاومة حيوية ضد الفطريات الممرضة للنبات. الوضع التقسيمى لهذا الفطر غامض (هذا رأى Grondona *et* al. سنة ١٩٩٧). وإن الميزان المستعمل فى تصنيف وتعريف السلالات لغاية ١٩٩٧ لم يزودنا بطرق تمييز كافية، خاصة مع تلك العزلات المهمة فى برامج المقاومة الحيوية. هناك دراسات عديدة تهدف لوضع أوصاف لهذه الكائنات الحية الدقيقة، تعتمد على أساس نشاطها فى التضاد مع الفطريات أو تضادها الحيوى أو تطفلها على الكائنات الاخرى أو باتحاد أى منهما.

لقد تم تقسيم *T.harzianum* الى ٣ – ٥ مجموعات Sub specific وذلك اعتمادا على السلالات وعلى نوع الدراسة المتبعة. هناك حوالى ١٥ عزلة من هذا الفطر، أعتمد فى تقسيمها على ٨٢ صفة مورفولوجية وفسيولوجية وبيوكيميائية وعلى ٩٩ أيزوانزيم من سبعة نظم إنزيمية.

المجمـوعة الاولـــى: Cluster I

تسمى هذه المجموعة *I* Cluster وهى تحوى ٧٠٪ من مجموع العزلات، وهذه المجموعة تقسم الى قسمين 1 a و *1b*.

المجموعة 1a: تشمل العزلات الموجودة فى بريطانيا ذات أرقام ٢٤، ٢٩٢٩، ٢٦، ٢٩، ٢٩٢٨، ٢٩٢٧ وتتميز بأنها ذات مقاومة حيوية جيدة فى إسبانيا. جميع هذه السلالات لها Intercalary Chlamydospores وذات hydrolyzed gelatin وتنتج صبغات صفراء على بيئة MEA

المجموعة *Ib* وتشمل عزلتين ذواتا أرقام ٢٩٢٥، ٢٩٣٣، وتختلف عن المجموعة *Ia* فى كونها لا تنتج Intercalary Chlamydospores ولا تعطى لوناً أصفر على بيئة MEN.

المجمـــوعة الثانيـــة Cluster II :

تشمل هذه المجموعة العزلات ذات الارقام ٢٦٠، ٣,١١، ٢٩٢٣ وهى تنتشر فى فرنسا وزمبابوى، لها فعالية عالية فى المقاومة الحيوية لأمراض والنبات وذات مستوى ضعيف فى نشاط Extracellular enzyme. جميع أفراد هذه المجموعة تنتج مستعمرات ذات قطر أقل من ٨ سم على بيئة *MEA*، وتكون جراثيم كونيدية بقطر اكبر من ٢,٤ ميكروميتر. تنتج صبغات برتقالية على بيئة تحوى ٢٥ ٪ جلسرول آجار.

المجمـــوعة الثالثـــة Cluster III:

تنتشر هذه المجموعة فى الهند وتشمل أرقام ٢٩٢٤، ٢٩٣٠، ٢٩٣٢، ٢٩٣١. تنتج جراثيم كونيدية أقل من ٢,٤ ميكروميتر وتعطى ميسيليوم هوائياً على بيئة شبكس أمونيوم آجار، وعلى نترات آجار وهيدرولايزد جلاتين وتنتج صبغات ارجوانية وتتكشف إلى لون أصفر على بيئة *MEA*.

إن سلوك عزلات الفطر *T.harzianum* المختلفة، فى المقاومة الحيوية، يختلف حسب الفطر المستهدف فى المقاومة الحيوية. فمثلاً إن المقاومة الكبيرة التى تحدث للفطر *Aphanomyces cochlioides*، تكون بسبب أن هذا الفطر ذو جدر خلوية مكونة من السليلوز بالمقارنة مع ما يحدث من تثبيط للفطريات الاخرى مثل *Phoma beta* و *R.solani*، *Acremonium cucurbitacearum*، *Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersi-ci* والتى تكون ذات جدر خلوية مكونة من الشيتين والجلوكان، وتكون المقاومة بسبب إنتاج إنزيم السليلوبيز من قبل جميع السلالات تقريباً. إن السلالة ٢٩٢٣ التابعة للمجموعة الثانية، هى العزلة الوحيدة التى لا تثبط نمو الفطر *P.betae* و *R.cochlioides* وبالمقابل فإن هذه العزلة تفتقر إلى إفراز البروتين وتظهر أقل مستوى من نشاطات الإنزيمات المحللة ضد الفطريات الأخرى. وبالتالى فإن هذه السلالة لا تعتبر من عوامل المقاومة الحيوية الفعالة،

وبالتالى يمكن القول بأن المستويات المختلفة فى المقاومة الحيوية التى يبديها الفطر *T.harzianum* تعتمد الى حد ما على نوع العزلة المستعملة فى المقاومة.

نظراً للاختلافات الواسعة ضمن الجنس *Trichoderma*، فمن الصعب استعمال أسماء معينة للنوع كما ذكرنا سابقاً.

المقاومة الحيوية للجنس Pythium بالجنس تريكوديرما

مقـــدمة:-

أنواع الجنس *Pythium* من بين الكائنات الممرضة الشديدة الخطورة، والكامنة فى التربة مسببة عفن البذور ومرض سقوط البادرات فى كثير من المحاصيل. على الرغم من الخسائر الاقتصادية الحقيقية المرافقة لأماكن تواجد هذا الجنس، إلا أن طرق مقاومته كيماوياً صعبة جدا، وذلك لأن التحكم فى الأمراض المتسببة عن الكائنات الكامنة فى التربة عن طريق معاملة البذور بالمبيدات الفطرية قد ثبت عدم فعاليته العملية. يعود السبب فى ذلك اساساً لظهور سلالات جديدة باستمرار من الفطر *Pythium* تكون مقاومة للمبيدات الفطرية، عدا عن أن هذه الكيماويات تضر بالبيئة، والأثر المتبقى السام لها فى المواد الغذائية سواء بالنسبة للنسان أو الحيوان. وبالتالى اتجهت جهود العلماء لإيجاد طرق بديلة فى مقاومة المراض عدا عن المبيدات الفطرية، أهم هذه الطرق البديلة هى المقاومة الحيوية. من أهم الكائنات الدقيقة المستعملة فى مقاومة الأمراض الكامنة فى التربة هو الفطر *Trichoderma*. أثبتت التجارب المعملية والحقلية على المقاومة الحيوية، مقدرة بعض سلالات الفطر المذكور على تخفيض لقاح الفطر *Pythium* فى التربة. لغاية مايو سنة ١٩٩٧ فإن الإجابة الشافية للطريقة التى بواسطتها يشارك التضاد الفطرى فى المقاومة الحيوية للفطر *Pythium spp* ليست واضحة تماما، مع أن ميكانيكية التضاد تشمل التطفل على الفطريات Mycoparasit-ism والتضاد الحيوى والمنافسة على الموقع والغذاء، كلها ذكرت بأنها تساهم كثيراً فى الاجابة عن التساؤل السابق. إذا وضعنا فى عين الاعتبار أن الفطر *Pythium sp* يتبع الفطريات البيضية والتى لجدر خلاياها تركيب مميز يحوى *B - (1,3) - (1,6) - D* - glu-cans وسليلوز بدلا من الشيتين chitin كمكون اساسى وكبير فى الجدار. وبالتالى يمكن أن نتوقع بأن الدور الذى يلعبه إنزيم Glucanases فى عملية التضاد الحيوى هو صحيح مائة فى المائة.

التفاعل الميسيليومي بين T.harzianum و P.ultimum

لقد تمت دراسة التفاعل بين هذين الفطرين وذلك كالاتى:-

ينمى الفطر *Pythium ultimun* سلالة BARR *447* على بيئة PDA ويوضع فى حضانة فى الظلام على حرارة ٢٦° م. أما الفطر *T.harzianum* سلالة (أو عزلة) *T-203* تنمى على بيئة PDA وتحضن على حرارة ٢٣ – ٢٥° م. لإجراء التجارب المزدوجة أخذت اقراص *PDA* (٥ ملم قطرا) من أطراف المزرعة القطرية النامية بقوة من مزرعة *T.harzianum* وأخرى من مزرعة *P.ultimum* ووضعت فى طبق جديد (فيه بيئة غذائية PDA) على سطح الطبق، تبعد عن بعضها البعض ٣ سم ثم حضنت الأطباق على حرارة ٢٥° م وتحت إضاءة مستمرة. عندئذ فإن الكائن المضاد وعائله كل منها ينمو باتجاه الاخر. لوحظ بعد ٤ – ٥ أيام من تحضين الأطباق ذات المزارع المزدوجة أن هيفات الفطر المضاد *T.harzianum* تنمو حتى تصل هيفات الفطر الاخر وتنمو عليها. وبعد سبعة أيام لوحظ أن الكائن المضاد كون أعداداً كبيرة من الجراثيم.

الدراسة بالميكروسكوب الالكتروني:

العينات الميسيليومية المأخوذة (بعد ٢، ٣، ٤، ٦، ٧ أيام من الحقن) من منطقة التفاعل فى تجارب المزارع المزدوجة، أخذت وجهزت للفحص بالميكروسكوب الإلكترونى. لوحظ فى العينات المأخوذة بعد يومين من الحقن أن هيفات الفطر المضاد، قد تم تشخيصها والتعرف عليها بسهولة، وذلك عن طريق سمك قطرها الأصغر من سمك قطر هيفات الفطر الاخر الممرض *P.ultimum* وتكون ملتفة حول خلاياه حيث تحضن الخلايا الرقيقة الخلايا السميكة.

شكل رقم ٨. يكون الالتفاف عادة شديداً ومحكماً حول هيفات الفطر *P.ultimum* مؤدية إلى انضغاط شديد لخلايا العائل، كما هو واضح عن طريق المظهر المتجعد لسطح الخلية. أما فى الأطوار المتقدمة من التطفل فان التفاف الفطر المضاد حول هيفات الفطر الممرض يزداد وتنهار خلايا العائل ويمكن تمييز ذلك بسهولة.

شكل رقم (٨) : صورة بالميكروسكوب الإلكترونى لتفاعل الفطر (T) *T.harzianum* مع الفطر (P) *P.ultimum*

a = التفاف هيفات الفطر T حول الفطر P (الاسهم) يلاحظ مظهر التجعد على سطح الخلية.

b = زيادة اعداد الفجوات.

المسطرة فى a = ٣ ميكروميتر.

المسطرة فى b = ٢ ميكروميتر.

الإجراءات الداخلة في التفاعل بين الفطرين

أخذت عينات ميسيليومية من منطقة التفاعل بين الفطرين، وأجريت عليها طرق معملية طويلة (مذكورة فى مجلة Applied And Environmental Microbiology الصادرة فى مايو ١٩٩٧ صفحة ٢٠٩٥ الى ٢٠٩٩)، وذلك لمعرفة الإنزيمات الداخلة فى التفاعل بين الفطرين. بينت الدراسة أنه فى العينات المأخوذة من المزرعة بعد يومين من الحقن أن خلايا *P.ultimum* المحاطة بواسطة هيفات الفطر *T.harzianum* يحدث فيها تغيرات مهمة تتميز أساسا عن طريق حدوث زيادة فى الفجوات وظهور انكماش موضعى فى الأغشية البلازمية فى المواقع النشيطة لاختراق الكائن المضاد (شكل *b* ، ٨). عند استعمال التكبيرات الكبيرة

يلاحظ انه فى معظم الحالات، فإن انكماش الغشاء البلازمى كان مترافقاً مع ترسب نسيج غشائى غير خلوى (Matrix) الذى فيه تركيبات صغيرة الكثافة الالكترونية مغمورة (شكل ٩). هذه الترسبات النصف كروية كانت معلمة بكثافة بواسطة المعلمات - B - 1,4 exoglucanase gold labeling. محاولات الكائن المضاد لاختراق هذه المواد المتكونة جديداً، نجحت كثيرا وأدت إلى نقص الكثافة على طول قناة الاختراق. الميكانيكية التى تتحكم فى عملية ترسيب السليلوز فى مثل هذه المناطق غير واضحة، مع أن هناك تفسيرين يمكن تقديمهما لذلك.

الاول: المواد المتجمعة يمكن أن تكون قد نشأت من جدار خلية العائل أثناء الانتفاخ ومط مادة البولى ميرز الموجودة مسبقاً. هذا يتطلب بوضوح فعل إنزيم السليوليز المنتج بواسطة الكائن المضاد، وهذا يمكن ان يقتضى ضمناً نقصاً فيما بعد فى المركبات السليلوزية المرتبطة فى جدار خلايا الفطر *Pythium*. وعلى أية حال فإنه فى ذلك الوقت بعد الحقن لم يمكن ملاحظة تغيرات واضحة فى جدر خلايا الفطر العائل أو إختلافات معنوية فى كثافة معلمات labeling السليلوز، بالمقارنة مع هيفات الكنترول النامية فى مزرعة مفردة. جدول رقم ٣٣.

الثانى : المواد المترسبة يمكن أن تكون قد ترسبت على شكل جزيئات مبنية حديثا. هذه الاحتمالية تثير سؤالا هو كيف تستطيع الخلايا الفطرية أن تنظم ترسيب المواد الشبيهة بتركيب الجدار فى مناطق غير عادية فى الخلية؟؟

البروتينات المرتبطة مع الأغشية مثل الانزيمات التى تكون متدخلة فى بناء مركبات بنائية، تعرف على أنها مرتبطة مع دهون، والتى تلعب دوراً كبيراً فى تنظيم نفاذية الأغشية البلازمية. التغيرات فى تركيب الدهون المتواجدة فى الأغشية البلازمية فى خلايا الفطر *Pythium*، من المحتمل أن تكون ناتجة من فعل مواد سامة منتجة من *T.harzianum* والتى تحث على نقض تنظيم الإنزيمات المرتبطة بالأغشية، مؤدية الى مناطق ذات ترسبات شبيهة بالجدار غير عادية. الدور الحيوى المضبوط للترسبات الغنية بالسليلوز لغاية الان غير مفهوم ولكن يمكن للباحث أن يتوقع أن التجمعات الكبيرة من المكونات التركيبية فى مناطق غير عادية تعكس استراتيجية دفاعية محكمة بواسطة خلايا الفطر *Pyhium* لمنع اختراق الكائن المضاد.

بمرور ٣ – ٤ أيام بعد الحقن (فى منطقة التفاعل بين الفطرين)، تظهر خلايا الفطر *Pythium* محطمة بشكل كبير وذلك عند قياسها بالتفاعل الكامل و / أو تفجر الغشاء

البلازمى وبواسطة التعضى غير المنتظم فى السيتوبلازم. تبدو جدر الخلايا أسمك منها فى الحالة العادية ومعلمة بالتساوى بـ Gold - complexed exoglucanase باستثناء المناطق التى يحدث فيها اختراق من قبل الفطر *Trichoderma*. بعد مرور ستة أيام من الحقن، تبدو هيفات الفطر *Pythium* (اساسيا) بشكل غير طبيعى، وعلى شكل قشور pleiomorphic فارغة (شكل ٩، *D*). فى الحالات المتقدمة من التطفل، فإن خلايا الكائن العضاد تتشعب كثيراً فى هيفات العائل وتخترق المنطقة التى عادة ما تكون مشغولة بسيتوبلازم العائل. هذا الاستعمار الكثيف، كثيرا ما يؤدى إلى ضغط ميكانيكى قوى (شكل ٩، *D* الأسهم) ضد جدر خلايا هيفات العائل. على الرغم من هذا التحطيم الكثيف لخلية العائل، فإن مناطق ارتباط ال Exoglucanase لا تزال ظاهرة فوق جدر خلية العائل حتى فى المناطق الملاصقة لمناطق الاختراق الفطرى (شكل ١٠، E). على أية حال فإن التحلل الكمى لـ Labeling يدل على نقص معنوى فى كثافة التعليم لطبقات جدار الخلية بالمقارنة مع تلك الموجود فى خلايا *Pythium* المجموعة بعد يومين من الحقن فى المزارع المزدوجة (جدول رقم ٣٣)

إن تفكك وارتخاء وحتى انحلال وذوبان الترسبات المتشكلة أولياً بين الأغشية البلازمية المنطوية وجدر خلية العائل، كانت غالبا مشاهدة فى مناطق اختراق *Trichoderma*، كما هو موضح عن طريق انطلاق أجزاء عديدة من الذهب على مسافات من منطقة الترسب (شكل ١٠، *E* الاسهم)، هذا يدل بوضوح على إنتاج كميات كبيرة من Cellulolytic enzymes. وباختبارات أخرى مشابهة، أثبتت ان بعض صفات التحطيم تظهر أساساً بواسطة التمزق فى طبقات الجدار الأكثر بعداً ، الذى يحدث فى مناطق جدار العائل المجاورة للاختراق الفطرى (شكل ١٠ الاسهم المزدوجة *E*). وعلى أية حال فان ما وجد، بأن السليلوز المعلم لا يزال متواجداً فوق الجدر المحطمة من الفطر *Pythium*، يؤدى الى القول بأن الإنزيمات المحللة للسليلوز ليست هى الصفة الحاسمة الوحيدة الداخلة فى عملية التضاد. مع أنه يبدو واضحاً أن مثل هذه الانزيمات تلعب دور المفتاح فى كسر جدر خلايا العائل فى مناطق محاولة الاختراق، إلا أنه يبدو محتملا أن هناك إنزيمات منتجة أخرى، تشارك أكثر فى الطور الترممى للكائن المضاد، عندما استعملت المركبات الرئيسية المرتبطة بالجدار على شكل مصدر للغذاء للتزويد بالطاقة اللازمة للتكاثر والتجرثم.

بعد سبعة أيام من الحقن، فإن خلايا الفطر *Pythium* كانت محطمة كلية، وفى معظم الحالات هناك كمية قليلة فقط من بقايا الجدار المعلمة كانت دليلا على الوجود السابق للخلية الفطرية (شكل ١٠، F) جدول ٣٣.

شكل رقم (٩) صورة بالميكروسكوب بالإلكترونى لتفاعل الفطر (T) *T.harzianum* مع الفطر (P) *P.ultimum*

c - انخفاض فى كثافة المعلمات على طول قناة اختراق الفطر T. الأسهم.

d - خلايا الكائن المضاد تخترق المنطقة المشغولة أساساً بسيتوبلازم العائل وتخلق ضغطاً ميكانيكياً على جدار خلية العائل (الأسهم).

المسطرة = ٠,٥ ميكروميتر

شكل رقم (١٠) تكملة لشكل رقم ٨،٩

E : تفكك وذوبان المواد الشبيهة بجدار الخلية فى منطقة إختراق T .

الاسهم المزدوجة = تمزق الطبقات الداخلية لجدار الكائن الممرض

F . اضمحلت خلايا P الى بقايا من الجدر والتى هى معلمة قليلا بمعلق Exoglucanase - gold complex

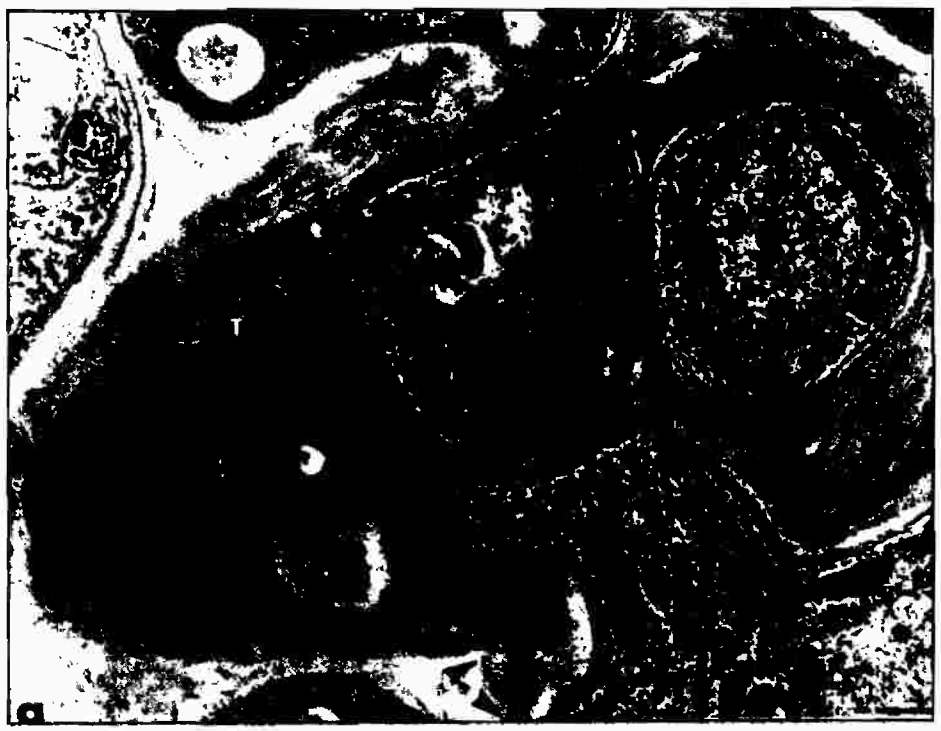
المسطرة فى E = ١ ميكروميتر

المسطرة فى F = ٠,٢٥ ميكروميتر

جدول رقم ٣٣ : كثافة المعلمات المتحصل عليها مع معقد الذهب B-1,3 glucanase , Exoglu-canase **فوق جدر خلية الفطر** *P.ultimum* **خلال تفاعله مع** *T.harzianum*

المعاملة	متوسط اعداد الاجزاء الذهبية لكل um^2 مع	
	Exoglueanase- gold	B- 1,3 - Glucanase- gold
كنترول (مزرعة مفردة)	١٤,٨ ∓ ٩٤,٦	١٢,٢ ∓ ٥١,٣
بعد يومين من التحضين	١٠,٣ ∓ ٨٧,٨	١٠,١ ∓ ٢٢,٦
بعد ٣ أيام من التحضين	٩,٥ ∓ ٧٨,٥	٦,٤ ∓ ١٠,٣
بعد ٤ أيام من التحضين	١٢,٢ ∓ ٦٠,٥	٢,٠ ∓ ٨,٢
بعد ٦ أيام من التحضين	٥,٣ ∓ ٣١,٨	٠,٥ ∓ ١,٠
بعد ٧ أيام من التحضين	٦,٤ ∓ ١٨,٥	صفر

بعد تحضين مقاطع من مناطق التفاعل مع المعقد الذهبى لـ B - 1,3 - glucanase، حدث نقص معنوى فى جدر خلايا *Pythium* المعلمة، وذلك بعد يومين من الحقن (جدول ٣٣). بعد ٣ – ٤ أيام من الحقن فإن التعليم كان منخفضاً الى شريحة بسيطة من الأجزاء الذهبية فوق طبقات جدار العائل الاكثر بعداً (شكل ١١). لوحظ فى مناطق اختراق الكائن المضاد انطلاق أجزاء ليبيفية معلمة (شكل ١١ رؤوس الأسهم). فى المراحل المتقدمة من التضاد (٦– ٧ أيام من الحقن) فإن جدر خلية الفطر *Pythium* المعلمة بـ B - 1,3 - glucanase قد اختفت (شكل ١٢، *b*). فى هذا الوقت يتجرثم الكائن المضاد بكميات كبيرة (شكل ١٢، *c*).



شكل رقم (١١) : صورة بالميكروسكوب الإلكترونى للتفاعل بين *T.harzianum* مع الفطر *Pythium ultimum* يشار اليه بحرف P.

a = التفاعل بعد ٣ أيام من الحقن، استعمار كبير لخلايا P، تجمع كبير للسيتوبلازم. يلاحظ انطلاق أجزاء الليبيفيات المعلمة (الأسهم).

المسطرة = ٠,٥ ميكروميتر.

شكل رقم (١٢) : تكملة لشكل رقم ١١ .

c + b = تفاعل بعد سبعة أيام من الحقن

B - 1,3 - Glucan لا تتواجد طويلاً فى الخلايا المتغيرة لهيفات P .

جراثيم (Ts) الفطر تريكوديرما تبدو على بيئة الآجار.

المسطرة فى c = ٠,٢٥ ميكروميتر

وفى b = ٠,٥ ميكروميتر

التغير الملاحظ فى مكونات B - 1,3 glucan فى جدار خلية العائل يكون متناسقاً مع الكفاءة المعروفة للفطر تريكوديرما فى إنتاج الإنزيمات Hydrolytic مثل B - 1,3 - gluca-nases . أما التغير فى B - 1,3 - glucans لا يحدث فقط فى مناطق الجدار الملاصقة لخلايا تريكوديرما ولكن أيضاً على مسافة من مناطق دخول الكائن المضاد، وبالتالى فإن B - 1,3 - glucanases يمكن أن تنتشر بحرية بين الخلايا وهذا ما يسهل للفطر تريكوديرما بالدخول خلال النسيج غير الخلوى المفكك. هذه الملاحظات تثير تساؤلا عن كيفية إضعاف جدار الخلية عن طريق فعل إنزيم B - 1,3 - glucanases المفرز من قبل تريكوديرما، وهل يمكن

أن تسهل انتشار المركبات السامة باتجاه المستقبلات الغشائية عن طريق زيادة نفاذية الجدار؟؟ وبالتالى يمكن التأكيد على أن الفعل الإنزيمى مع المضادات الحيوية لهما دور فعال فى تفاعل المقاومة الحيوية للفطر *T.harzianum*. وبالتالى يمكن القول بأن المقاومة الحيوية التى يقوم بها الفطر المضاد المذكور ضد الفطر الممرض *Pythium* تعتمد على:-

١ - إدراك والتصاق الفطر تريكوديرما مع الفطر *Pythium*، حيث إن هذا الاخير يشجع إنبات الجراثيم الكونيدية للفطر الأول.

٢ - إنتاج إنزيمات B - 1,3 - glucanases التى تضعف جدر خلية العائل، وإنتاج كمية قليلة من أنزيم السليوليز لتسمح باختراق موضعى للكائن المضاد.

٣ - إنتاج مضادات حيوية لتفسد نظام الميتابولزم فى العائل.

٤ - اختراق خلية العائل وإنتاج نشيط لإنزيم السليوليز يؤدى إلى تحطيم خلية الكائن الممرض.

التفاعل الهيفي بين T.harzianum والفطر Sclerotinia sclerotiorum

مقـــدمة

يسبب الفطر *S.sclerotiorum* أمراضاً خطيرة فى كثير من المحاصيل، مثل فول الصويا، عباد الشمس وكذلك لكثير من نباتات الخضار فى المناطق المعتدلة والرطبة. مع أن الفطر *T.harzianum*، ثبت بأنه فعال فى منع تكوين الأجسام الحجرية لكثير من الفطريات الممرضة للنبات، إلا أن ظاهرة التطفل الفطرى Mycoparasitism تلعب دوراً مهماً فى مقاومة الفطر *S.sclerotiorum* فى حقول التجارب. لقد تم معرفة التفاعل التطفلى بين الفطر تريكوديرما والفطريات الممرضة النباتية الكامنة فى التربة باستعمال الميكروسكوب الضوئى والإلكترونى.

تفاعـــل الفطـــرين

لقد درس التفاعل الهيفى بين الفطر *T.harzianum* سلالة *(BAFC cult No:72)*، المتطفلة على الفطريات والفطر الممرض النباتى *S.sclerotiorum* فى المزارع المزدوجة

dual culture وفى التربة المعقمة باستعمال الميكروسكوب الضوئى والإلكترونى. فى المزرعة المشتركة فإن هيفات الفطر المضاد تنمو باتجاه وتلتف حول هيفات الفطر الممرض (شكل رقم ١٣) . اما زيادة كثافة لفات هيفات الفطر تريكوديرما والتحطم الأولى لخلايا الفطر الممرض، فإنها تلاحظ فى المراحل المتأخرة من التطفل.

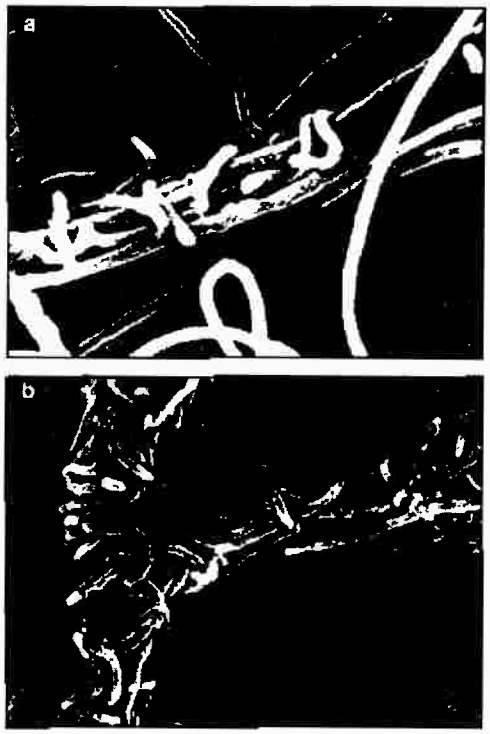
فى التربة المعقمة تنبت الجراثيم الكونيدية للفطر *T.harzianum* (المضاد) وتتكشف إلى ميسيليوم، وتتصل مع هيفات الفطر الممرض *S.sclerotiorum* وتشكل تفرعات قصيرة وأجساماً شبيهة بأعضاء الامتصاص والتى تساعد فى القبض والاختراق لجدر خلية العائل.

هناك نظام قد استعمل فى المعمل لاختبار مقدرة الفطر المضاد فى مقاومة مرض ذبول *Sclerotinia* فى الخيار والخس، حيث كانت تغسل بذور الخيار تحت الماء الجارى ثم يطهر سطحها بمادة *NaOCl* او فى ٥٪ إيثانول، ثم تغمر بعد ذلك فى معلق الجراثيم الكونيدية بنسبة ٥ x ١٠^{١٠} وحدة تكوين مستعمرات / مل من الفطر المضاد *T.harzianum* ثم تترك لتجف هوائيا وتزرع فى بيئة *Peat* مخلوط بنسبة ١٠٠٪ من الفطر الممرض *S.sclerotiorum* ثم توضع فى مراقد الإنبات على حرارة ١٧°م لمدة ٢٠ يوما. أما بالنسبة لتجارب الصوبا الزجاجية، فكانت تمزج التربة التى تزرع فيها بادرات الخس، بالجراثيم الكونيدية للفطر المضاد بتركيز ٣ x ١٠^{١٠} جرثومة /غرام تربة. كان يستعمل لقاح الفطر الممرض على شكل قطع من الآجار، الذى يحمل أجساماً حجرية منبتة بنسبة ٢ جسم حجرى منبت يدفن على عمق ٣ سم تحت سطح التربة، وعلى بعد ٢ سم من جذور البادرات.

إن تغليف البذور بالجراثيم الكونيدية للفطر المضاد، يؤدى الى خفض سقوط البادرات قبل وبعد ظهورها فوق سطح التربة المتسبب عن الفطر *S.sclerotiorum* فى الخيار بنسبة ٦٩ و ٨٠٪ بالترتيب، وفى الخس بنسبة ٤٦ و ٧٢٪ بالترتيب.

أما فى الصوبات الزجاجية فإن المرض المتسبب عن الفطر نفسه فى الخس قد انخفض بمعاملة البادرات بتحضيرات من البيت والنخالة ناميا عليها الفطر *T.harzianum*. وعلى الرغم من عدم الخفض المعنوى لهذا المرض، إلا أن بادرات الخس المعاملة بالفطر تريكوديرما نمت وتكشفت أفضل من الكنترول. أما فى عباد الشمس، كان هناك خفض معنوى، بمعدل يتراوح من ٦٨- ٨٤٪ فى حدوث المرض، قد تم الحصول عليه عن طريق خلط تحضيرات الفطر المضاد مع البيت والنخالة ووضعها فى منطقة جذور النبات. التطفل

الفطرى على الهيفات، عدا عن التطفل على الأجسام الحجرية، هو المقترح فى تفسير الميكانيكية التى بواسطتها يقاوم الفطر المضاد الفطر الممرض تحت هذه الظروف.



شكل رقم ١٣ صورة بالميكروسكوب الإلكترونى للتفاعل الهيفى بين الفطرين *T.harzianum* والفطر *S.sclerotiorum* فى المزرعة المزدوجة على بيئة صناعية.

a : هيفا الفطر تريكوديرما نامية على طول هيفات الفطر *S.clerotiorum* ومتفرعة باستمرار وملتفة حولها.

b : المراحل الأخيرة من التطفل. يظهر التفاف الهيفات بكثافة شديدة حول هيفات الفطر الممرض وتتحطم الخلايا.

المقياس ١٠ ميكروميتر.

تأثير الفطر المضاد تريكوديرما على الاجسام الحجرية للفطر *S.sclerotiorum*

هناك عديد من الكائنات التى تتغذى أو تتطفل على الأجسام الحجرية، قد درس احتمال كونها عوامل مقاومة حيوية. لقد ذكر Merriman سنة ١٩٧٦ أن الفطريات *Trichoderma*

sp.، *Penicillium sp* و *Fusarium sp.* وفطريات ترية أخرى تستعمر الأجسام الحجرية للفطر *S.sclerotiorum*. ولقد ذكر كل من Whipps و Budge سنة ١٩٩١ أن الفطريات *Gliocladium virens* و *Sporidesmium sclerotivorum* تستطيع أن تحطم الاجسام الحجرية للفطر *Sclerotinia sp* وأظهر أدلة على إمكانية استعمالها فى المقاومة الحيوية.

لقد ذكر Reeleder و Anas سنة ١٩٨٧ أن يرقات *Bradysia coprophil* تحطم الاجسام الحجرية لكثير من الفطريات الممرضة أثناء التغذية، وبالتالى تؤثر على بقاء الأجسام الحجرية حية وتزيد من قابليتها للإصابة بالكائنات الفطرية المتطفلة على الفطريات. بالاضافة لذلك فإن الأجسام الحجرية التى تأثرت بيرقات الحشرة السابقة يتطفل عليها الفطر *T.viride* بكثافة أكثر منه فى حالة الأجسام الحجرية غير المتأثرة بتغذية اليرقة. إن الإفرازات المغذية لليرقة تخفض مقدرة الأجسام الحجرية على الإنبات، هذا يمكن أن يكون بسبب نشاط إنزيم الـ chitinase فى المواد المفرزة. وبالتالى يمكن القول بأن إضافة مجموعات من هذه اليرقات فى ترية الحقل يمكن أن تؤدى الى خفض مدة بقاء الأجسام الحجرية حية فى الترية.

وجد فى معظم التجارب أن هناك عزلتين من الفطر *T.hamatum* تسبب تحطيماً كبيراً فى الأجسام الحجرية للفطر *S.sclerotiorum*، هما *3* - TMCS و *21* -TMMS والمعزولتين من الطين او الترية الملوثة بالسماد البلدى. كانت النسبة المئوية للاجسام الحجرية المنبتة منخفضة (صفر و ٣٪) تحت تأثير العزلتين المذكورتين بالترتيب، بالمقارنة مع الكنترول ٤٢٪. كذلك فى جميع المعاملات فإن تجرثم الكائن المضاد لوحظ بعد عشرة أيام.

أما بالنسبة لدور يرقات *B.coprophila* فان نوع الأضرار التى تسببها للاجسام الحجرية تختلف عن تلك الأضرار التى يسببها الفطر *T.hamatum*. فى الطور الأول من التحلل فإن طبقة القشرة من الجسم الحجرى تتحطم بواسطة التغذية باليرقة، بعد ذلك تتغذى اليرقة على طبقة النخاع مسببة أنفاقاً، حتى يصبح الجسم الحجرى كله مستهلكاً. أثناء التغذية فإن قطعاً سوداء من قشرة الجسم الحجرى تمر خلال الجهاز الهضمى ثم تفرز خارجا دون اى تحلل يذكر.

وبالمقابل فإن الفطر *T.hamatum* يخترق القشرة السوداء ويبدأ فى التحطيم الكلى للجسم الحجرى من الداخل. تبقى القشرة ذات مظهر سليم بصورة عامة دون ظهور أية اعراض

للأضرار فى البداية، ولكن الجسم الحجرى المستعمر بالفطر يأخذ المظهر المتجعد. إن وجود الفطر *T. hamatum* يبدو أنه ليس له أية تأثير على سلوك تغذية اليرقة. وعلى أية حال فإن تغذية اليرقة فى المرحلة الاولى تبدأ فى المناطق التى لم يوطد الفطر تريكوديرما نفسه فيها. لقد وجد أن اليرقة لا تستعمل الفطر تريكوديرما غذاء لها أبدا.

الاجسام الحجرية المعزولة من التربة المعقمة والمعاملة بالفطر تريكوديرما (حيث فقط العزلة *TMCS- 3* التى استعملت) تبين انه بين ٥٠ و ١٠٠ ٪ من سطوحها استعمرت بواسطة الفطر *T.hamatum*. أما فى التربة غير المعقمة فإن النسبة المئوية للسطح المستعمر كان لايزيد عن ٢٥ ٪ أما عند إضافة يرقات *B.coprophila* فإن النسبة المئوية لاستعمار السطح لم تزداد معنويا.

وجد أن الفطر *T.viride* له تأثير مضاد على *Phytophthora cinnamomi*,

P. fragariae, P. nicotianae ، P.cactorum

II : الجنس Gliocladium

الفطر Gliocladium roseum

مقـــدمة :

الكائنات الحية الدقيقة المضادة، لها دور كبير فى مقاومة كثير من أمراض النبات. لقد أجريت تجارب كثيرة لمقاومة مرض العفن الرمادى Gray mold وأمراض أخرى متسببة عن الكائن الممرض المهلك *Botrytis cinerea* فى الفواكه والخضروات والمحاصيل الحقلية، غراس أشجار الغابات ونباتات الزينة ومحاصيل أخرى. إن ظاهرة التضاد الميكروبى ضد الفطر *B.cinerea* من أهم طرق المقاومة الحيوية الملائمة وذات كفاءة عالية فى الوقت الحالى، ويمكن أن تكون مترافقة مع طرق المقاومة الاخرى، أو تستعمل لوحدها، وذلك حسب شدة المرض والظروف البيئية، وبالتالى 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 الممرض. 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 ودورة كعامل مقاومة حيوية.

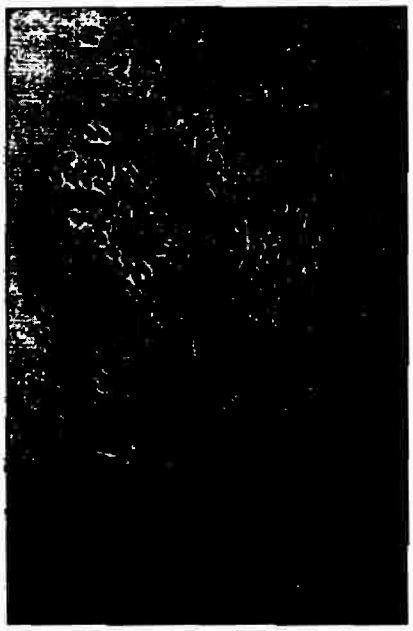
الشكل الخارجي والتصنيف:

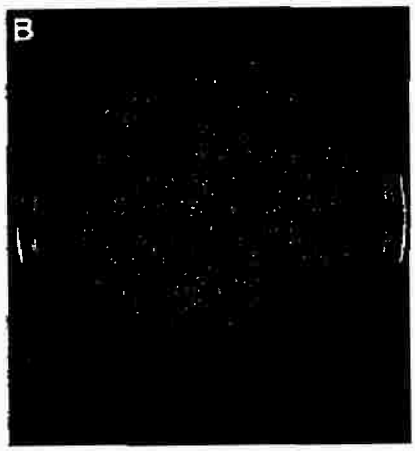
الفطر *G.roseum*. الاسم المرادف *Nectria ochroleuca*، وهو من الفطريات الإسكية المسماة Hypocreales وواحد من الـ hyphomycete غير العادية، والتى تنتج جراثيم

كونيدية، ذات خلية واحدة، على نوعين متميزين من الحوامل الكونيدية. النوع الأول متفرع على شكل Penicillately (خصل)، والثانى متفرع على شكل سوارى Verticillately (شكل رقم ١٤). تكون مستعمرات الفطر على بيئة الاجار بشكل عام، مبيضة برتقالية أو ذات لون سلامونى. يعتبر الفطر مختلف جنسياً عن عامل المقاومة الحيوية *Gliocladium virens*، والذى يسمى الآن *Trichoderma virens*، ويختلف أيضاً عن النوع النموذجى المسمى *Gliocladium penicillioides*. ولقد اقترح العالم Domsch *et al* سنة ١٩٨٠ أن الفطر *G.roseum* يدخل فى الجنس *Clonostachys* واقترح بان يشار إليه بأنه مجموعة من الأنواع.

البيـــئة:

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





شكل (١٤) : الفطر *Gliocladium roseum*.

A : حوامل كونيدية : سوارية فى الأعلى.

خصلية فى الأسفل.

B : نمو الفطر على بيئة PDA.

1 - Sclerotinia sclerotiorum

2 - Phymatotrichum omnivorum

3 - R.solani

4 - Botrytis spp.

5 - Verticillium spp.

وفطريات أخرى فى التربة وعلى الأجزاء النباتية. ومنذ أوائل ستينيات هذا القرن فإن الفطر *G.roseum* قد حصل على شهرة عالمية كفطر متطفل mycoparasite على كثير من الفطريات.

كذلك فان هناك أشكالاً متعددة جديرة بالاهتمام من الفطر *G.roseum* تكون مرافقة للجذور، السيقان، الأوراق، الثمار وبذور النباتات. يتواجد الفطر على سطوح النبات مثل المجال الورقى فى الفراولة وسطح الميكورهزا فى نبات *Abies alba*. وتشير التقارير إلى أن

الفطر يتواجد بكثرة ضمن المجموع الخضرى والجذور الميتة والتى 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 *G.roseum* قادر على استعمار أجزاء نبات فول الصويا دون إنتاج 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 الى أن الفطر *G.roseum* 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 *G.sroseum* 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 *G.roseum* في المقاومة الحيوية

إن عملية اختيار الكائن الحى الدقيق فى المقاومة الحيوية، من الأمور الصعبة، حيث تكون أمام الباحث أعداد مذهلة من العزلات الميكروبية، والتى تستطيع أن تقوم بدور المقاومة الحيوية، ويكون من الصعوبة تبرير أو تثبيت التقييم، أو تحديد الكفاءة المثلى لاى منها فى المقاومة الحيوية، حيث إن هذه الامور تحتاج الى الحصر الطبيعى للميكروب ويتطلب امكانية استعمال الميكروب فى الانتاج التجارى (ذكر هذا الموضوع بالتفصيل فى الجزء الأول من الكتاب).

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 المختبرة. تشمل طرق الاختيار الفطريات

الخطيطة، الخمائر والبكتيريا، التى تعزل من الأوراق الميتة والحية ومن السيقان والأزهار والثمار، من نباتات العائل الخالية من مبيدات الافات، 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 التى تفتقر الى التنوع المرغوب فى الميكوفلورا، حيث ترش بالمعلق المائى من التربة وتحضن فى جو عالى الرطوبة قبل إعادة عزل السلالة، وكذلك فإن نباتات العائل بدورها، تعمل كمادة اختبار وكمادة تفاعل للكائنات الدقيقة الطبيعية، وبالتالى تضيق مجال الكائنات الدقيقة للتقييم فى اختبارات الاختيار. بالنسبة لبعض العوائل، فإن هذا المجال يمكن تضيقه كثيراً، وذلك عن طريق إضافة جراثيم كونيدية من الفطر *B.cinerea* الى النباتات، وأخيراً إعادة اكتشاف الكائنات الدقيقة فقط من أجزاء النسيج التى فشل الكائن الممرض فى التجرثم عليها، الا أن الفطر *G.roseum* كان قد تم عزله مراراً من الأنسجة الحية والميتة تقريبا، من جميع العوائل المختبرة.

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

المقاومة الحيوية للفطر B.cinerea

١- على الفراولة:

كان أول ظهور للفطر *G.roseum* كمضاد ذى قوة عالية ضد الفطر *B.cinerea*، فى الدراسات التى أجريت على الفراولة فى اوائل الثمانينيات. تبين أن عزلات الكائن المضاد

تثبط باستمرار الفطر الممرض المذكور بنسبة حوالى ٩٨ ٪ أو اكثر، وذلك فى الاختبارات التى أجريت على الاوراق المتصلة وغير المتصلة بالنبات والبتلات والأسدية. وكذلك وجد أن هذا الكائن المضاد، يؤدى دوره بثبات واستمرارية بطريقة أفضل من كائنات حية دقيقة أخرى مثل *Trichoderma viride*، *Alternaria alternata*، *Myrothecium verrucaria* و *Penicillium spp.* والمبيد الفطرى القياسى كبتان. تكون الانسجة التى تستعمل فى الاختبار عادة محقونة بالكائن الحى الدقيق المضاد بنسبة 10^{7} جرثومة كونيدية/ مل ماء، بالإضافة لمادة مطهرة سطحية للفطريات، ثم يضاف لهذه الانسجة بعد ٢٤ ساعة الفطر الممرض *B.cinerea* بتركيز 10^{6} جرثومة كونيدية/ مل ثم بعد ذلك تحضن على *PCA* ثم تقيم مقدرة التجرثم فى الكائن الممرض.

وعلى أية حال، فإن أفضل طريقة للتقييم، كانت تجرى فى قطع من الحقل مزروع فيها نباتات الفراولة على خطوط. كانت تستعمل الفطريات المختبرة بنسبة 10^{6} جرثومة كونيدية/ مل، أو المبيد الفطرى كبتان، أسبوعيا لوقاية الازهار، الطريق الرئيسى لاختراق الثمار بواسطة الفطر الممرض *B.cinerea* فى الفراولة. كانت تجرى التجارب بسرعة قبل حلول الليل ونزول الندى، معتمدة فى ذلك على أن الندى والظلام يمكن ان يسهلا بقاء وفعالية عامل المقاومة الحيوية.

أجريت أربعة اختبارات على صنف الفراولة Red cot، فوجد أن الفطر *G.roseum* يثبط تواجد الفطر الممرض فى الاسدية والثمار بحوالى ٧٩ ٪ الى ٩٣ ٪ و ٤٨ ٪ الى ٧٦ ٪ بالترتيب.

هذه النتيجة، أفضل من النتائج المتحصل عليها، من أى عامل مقاومة أخرى أو حتى عند استعمال المبيد الفطرى كبتان. كذلك فان الفطر *G.roseum* كان أيضا ذا فعالية تشبه فعالية الكبتان ضد الفطر الممرض فى ثمار ثمانية أصناف فراولة. كما هو الحال فى الزراعات التجارية فإن الفطر الممرض *B.cinerea*، يكون بشكل عام متمرداً ويتجرثم على ١٥ – ٣٠ ٪ من الثمار، فيما لو كانت النباتات معاملة بالمبيد الفطرى المناسب أو الفطر المضاد *G.roseum*. إن التفسير المعقول لهذه الفروق العالية من نسبة التجرثم، يكون، لأن الأزهار فى بعض الاصناف المختبرة تبقى متفتحة لبضعة أيام فقط، وبالتالى يمكن أن تكون قد هربت من المعاملات الأسبوعية، أو أنها قد عوملت متأخرة كثيراً، وبالتالى ظهرت فيها

نسبة التجرثم المنخفضة ١٥ ٪، أما فى الأصناف الأخرى، فإن الاختبارات قد تكون شديدة فى تلك القطع، عندما حقنت صناعيا بالفطر الممرض وحدث تجرثم لهذا الكائن فى الثمار المجموعة بنسبة ٣٠ ٪، وقد قدرت فقط بعد عدة أيام فى درجة حرارة الغرفة العادية ورطوبة عالية. تعتبر الطرق المحسنة لتوقيت وتطبيق المعاملات وسيلة جيدة لتحسين فعالية المقاومة الحيوية فى الحقل.

الاستعمالات الأسبوعية للفطر *G.roseum* (٦١٠ جرثومة كونيدية/ مل) تعطى مقاومة جيدة للفطر الممرض *B.cinerea* على الفراولة المزروعة فى بيوت زجاجية مغطاة بالبلاستك فى حالة المناخ شديد الرطوبة. انخفض الفقد فى الثمار وقت الجمع أو بعد ٤ – ٥ أيام من الجمع بنسبة ٧٣ و ٤٨ ٪ بالترتيب فى الفراولة المعاملة بالفطر المضاد، بالمقارنة مع ٦٤ و ٣٦ ٪ باستعمال برنامج المبيد الفطرى أسبوعياً. بالإضافة للأزهار والثمار فان *G.roseum*، ثبتت فعاليته بشكل ملحوظ ضد الفطر *B.cinerea* على المجموع الخضرى فى الفراولة، حيث إن المجموع الخضرى هو المصدر الرئيسى للقاح فى الكائن الممرض فى زراعات الفراولة. فى بعض التجارب التى أجريت فى ستة خطوط، حيث أجريت عمليات الوقاية فى الربيع، أواخر الصيف، وبداية الخريف، كان المجموع الخضرى يحقن بالفطر الممرض (٥١٠ الى ٦١٠ جرثومة كونيدية/ مل) فان الرش متأخراً ٢ – ٥ أسابيع بلقاح الفطر المضاد *G.roseum* او فطريات المقاومة الحيوية الأخرى (٧١٠ جرثومة كونيدية / مل) او باستعمال المبيد الفطرى كلوروثالونايل، حيث إن هذا المبيد ذو فعالية استثنائية ضد الفطر *B.cinerea* فى أوراق الفراولة. وجد فى معظم الحالات أن الفطر المضاد *G.roseum* يثبط إنتاج الجراثيم فى الفطر *B.cinerea* على الاوراق بحوالى ٩٠ – ١٠٠ ٪ وكان دائما ذا فعالية تشبه فعالية الكلوروثالونال. إن كلا من الفطر المضاد *G.roseum* والمبيد الفطرى المذكور تثبط الكائن الممرض بحوالى ٦٠ ٪ فقط فى الاوراق التى قضت الشتاء ووصلت الى نصف طور الشيخوخة.

٢- توت العليق Raspberry

لقد وجد أن عزلات الفطر G.roseum، بشكل عام، تساوى أو تزيد فى تأثيرها عن الكائنات الحية الدقيقة المضادة الاخرى والمبيد الفطرى الكبتان ، عند اختبارها ضد الفطر الممرض *B.cinerea* على نبات العليق فى الحقل. يتطلب التثبيط الشديد، عادة، معاملة

الأزهار والثمار بالكائن المضاد، وذلك بسبب أن الفطر الممرض قادر على أن يهاجم الثميرات الصغيرة مباشرة، بالإضافة الى ذلك، عن طريق الاختراق خلال أنسجة الزهرة. عند معاملة العناقيد الزهرية فى أصناف العليق التى تثمر صيفا، بالفطر الممرض بمعدل ٥ x ١٠^{٣} جرثومة كوندية/ مل (معاملة كنترول) او مع أى من الكائنات المضادة *G.roseum*، *T. viride*، *Trichothecium roseum* جميعها بتركيز ١٠^{٦} جرثومة كونيدية/ مل ماء. كانت تقدر شدة المرض بعد كل مرة تجمع فيها الازهار أو الثمار حيث كانت تحضن فى رطوبة عالية على ٢٠ – ٢٢ ° م لمدة عشرة أيام. دلت النتائج على ان الكائنات المضادة والمبيد الفطرى كابتان تثبط الفطر الممرض *B.cinerea* فى الأزهار والثمار غير الناضجة بنسبة ٥٧ – ٧٣ ٪ و ٣٧ – ٦١ ٪ بالترتيب. أما فى التجارب التى أجريت على الثمار التى تحمل فى الصيف والخريف فإن الفطر المضاد *G.roseum* يثبط عفن الثمرة بحوالى ٢٧ – ٥٤ ٪ عندما يستعمل مرة واحدة على عناقيد الأزهار وبحوالى ٤٨ – ٦١ ٪ عندما كان يستعمل عندما تكون العناقيد الزهرية عند بداية التزهير ومرة ثانية عند تكشف الثمار، أما بالنسبة لتأثير الكبتان فكان ١٨ – ٢٥ ٪ و ٢٣ – ٤٠ ٪. إما تحت ظروف تأخير أو إطالة فترة التزهير والإثمار، تكون هناك ضرورة لتكرار المعاملة اكثر من مرتين للحصول على أفضل مقاومة لمرض عفن الثمار فى العليق. كذلك وجد أن الفطر *G.roseum*. له أيضا قوة مضادة للفطر *B.cinerea* فى الأوراق والقصبات فى العليق (شكل ١٥).

٣ - غراس الصنوبر والبيسيه

مع أن الفطر *G.roseum* لم يكن من بين المئات المتعددة من الميكروبات التى تم عزلها من أشجار الصنوبر Conifer فى منطقة Ontario، إلا أنه أمكن إثبات أن هذا الفطر له دور مضاد ضد الفطر *B.cinerea* فى غراس البيسيه السوداء Black spruce لا يقل عنه فى الفراولة. أما فى تجارب غرف التربية، فإن العزلات من *G.roseum* تثبط الفطر الممرض المذكور تماماً، وكان تأثيره أفضل من تأثير ١٣٢ عزلة ميكروبية من الصنوبر. كان هناك عزلة واحدة فقط من *T.viride* وعزلة واحدة من *Trichothecium spp* قد وصلت فى كفاءتها الى كفاءة الفطر *G.roseum* فى المقاومة الحيوية للفطر المذكور الممرض. أما فى دراسات الصوبا الزجاجية، فإن برامج المعاملة قد بدأت بالتزامن مع وقف نمو العروش،

وهذا موعد ابتداء ظهور وباء العفن الرمادى عادة. استعملت أربع معاملات من الفطر *G.roseum* بتركيز 10^{6} أو 10^{8} جرثومة كونيدية لكل ملم على فترات ٢ – ٤ أسابيع، كلها ثبطت إنتاج الجراثيم فى الفطر الممرض، وثبطت أعراض مرض العفن الرمادى على الغراس بطريقة مشابهة أو أكثر فعالية مما تحدثه المعاملة بمادة Chlorothalonil عند استعمالها فى نفس الوقت.

وجد فى التجارب اللاحقة فى الصوبا الزجاجية أن استعمال الفطر *G.roseum* يخفض حدوث الإصابة وقتل الأفرع بحوالى ٦٣– ٨١٪ بالمقارنة مع نسبة ٤٤ – ٥٥٪ التى تظهر عند استعمال مادة Chlorothalonil. أما عند إجراء معاملة مفردة واحدة من الفطر المضاد بتركيز 10^{6} جرثومة كونيدية/مل وقت انغلاق العروش، وجد أنها تثبط الكائن الممرض بكفاءة تساوى كفاءة استعمال مادة Chlorothalonil ستة مرات على فترات ١ – ٢ اسبوع ابتداءً من انغلاق العروش. إن فاعلية المقاومة الحيوية للفطر *G.roseum* كانت مستمرة بشكل غير عادى (استثنائى) لمدة ٨ – ١٢ اسبوع او اكثر.

عند معاملة غراس البيسيه السوداء بالفطر *G.roseum* بتركيز ٥ x 10^{7} جرثومة كونيدية/مل وحفظها تحت رطوبة نسبة عالية لمدة ٢٤ ساعة، ثم بعد ذلك حقنت بالكائن الممرض *B.cinerea* بتركيز ٥ x 10^{5} جرثومة كونيدية لكل مل، ثم أعيدت تحت الرطوبة نفسها، لمدة ٢٤ ساعة وحرارة ٢٠ – ٢١° م ثم بعد ذلك نقلت الى مراقد الانبات Growth chamber ثم فحصت كل ٢ – ٤ أيام لمعرفة كفاءة تجرثم الكائن الممرض ومحتواها من الكلوروفيل ومعدل اجراء عملية التمثيل الضوئى. وجد أه بعد ٦ – ١٥ يوماً فان الفطر الممرض تجرثم فى ٥٦– ٦٣٪ من الأوراق الابرية ، وأنتج (٢٩,٣ الى ٤٠,٥) x 10^{7} جرثومة كونيدية لكل ورقة إبرية فى النباتات التى عوملت بالكائن الممرض فقط (الكنترول)، بينما النباتات التى عوملت بالكائن المضاد قبل حقنها بالكائن الممرض، فإن حدوث التجرثم للكائن المضاد كان ١ – ٨٪ وإنتاج الجراثيم (٠,٥ – ٦,٦) x 10^{3} جرثومة كونيدية لكل ورقة إبرية وإن الكائن الممرض لم يتجرثم فى البادرات المعاملة بالكائن المضاد والماء (شكل رقم ١٦).

وجد أيضا أن الفطر المضاد يحدث تغيرات معنوية فى مستوى الكلوروفيل فى النباتات المعاملة والمحقونة بالفطر الممرض، وكذلك فإنه يمنع تخفيض مستوى التمثيل الكلوروفيلى

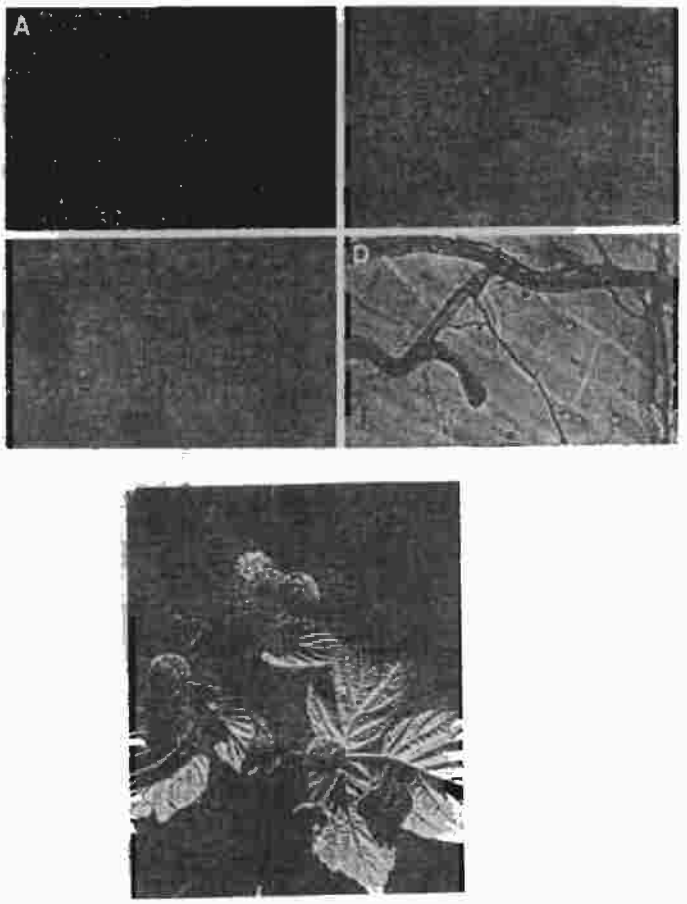
(الضوئى) فى النباتات المصابة بالفطر الممرض، ولكن ليس له تأثير على هذه الصفات عندما لا يكون الكائن الممرض موجوداً.

اما فى غراس الصنوبر الاحمر وجد أيضا أن الفطر *G.roseum* يعطى نتائج جيدة عند استعماله بتركيز $^{8}10$ جرثومة كونيدية / مل فإنها تثبط الفطر الممرض *B.cinerea* بحوالى ٨٨٪ فى غراس ذات عمر سنة واحدة، والمحقونة بالكائن الممرض بتركير $^{6}10$ جرثومة كونيدية لكل مل. كان الكائن المضاد أيضا قوياً فى معالجة العفن الرمادى فى الغراس ذات عمر سنتين وثلاثة سنوات النامية فى وجود اللقاح الطبيعى من *B.cinerea* فى الصوبات الزجاجية والمشاتل خارج الصوبا الزجاجية.

خضار ونباتات زينة في الصوبا الزجاجية

إن الأداء القوى للفطر *G. roseum* ضد الفطر *B.cinerea* فى العوائل المتنوعة مثل الفراولة والصنوبر، يدعم فكرة الاعتماد على أن هذا الكائن المضاد، يمكن أيضا أن يكون فعالاً ضد الكائن الممرض على كثير من النباتات النامية فى الصوبا الزجاجية، والتى تكون قابلة للإصابة بالفطر. فى دراسة مقارنة وجد أن العزلات الميكروبية المضادة المرافقة لنباتات الصوبا الزجاجية والتى يحصل عليها من المجموع الخضرى والازهار فى النباتات ذات المكروفلورا التى تم زيادتها بمعاملة مسبقة بمعلق من التربة الطبيعية. لقد تم الحصول على عزلات *G.roseum* باستمرار من أحد عشر نوعاً من نباتات الصوبا الزجاجية المستخدمة فى اختبارات المقاومة الحيوية، وقيمت على العوائل نفسها التى عزلت منها.

وجد أن الفطر *G.roseum* يثبط نمو الفطر *B.cinerea* بحوالى ٩٤٪ الى ١٠٠٪ فى اختبارات أقراص البيجونيا ونبات بخور مريم والجيرانيم، وفى اختبارات أجزاء الساق من الخيار، الفلفل والطماطم. لم يكن هناك أى كائن حى دقيق له تأثير أقوى من تأثير *G.roseum* ، قليل من العزلات الميكروبية الأخرى كانت ذات أداء مقارب لأدائه، باستثناء حالة نبات بخور مريم.



شكل رقم ١٥ تكشف تفاعل *G.roseum* مع الكائن الممرض *B.cinerea* فى العليق.

A : حوامل كونيدية سوارية وعلى شكل الخصلة للفطر المضاد *G.roseum* على نسيج الورقة الحية.

B : إنبات الجرثومة الكونيدية، وتكوين عضو التصاق للفطر *B.cinerea* فى الورقة فى غياب *G.roseum*.

C : عدم إنبات الجرثومة الكونيدية للفطر *B.cinerea* على الورقة فى وجود هيفات الفطر المضاد.

D : هيفات ضيقة من الفطر المضاد تلتف حول وتخترق هيفا سميكة من الفطر الممرض.

G : اعراض مرض العفن الرمادى المتسبب عن *B.cinerea* على ثمار العليق.

شكل رقم (١٦) : علامات واعراض مرض العفن الرمادى المتسبب عن الفطر *B.cinerea* على سيقان والأوراق الإبرية لغراس البيسيه السوداء.

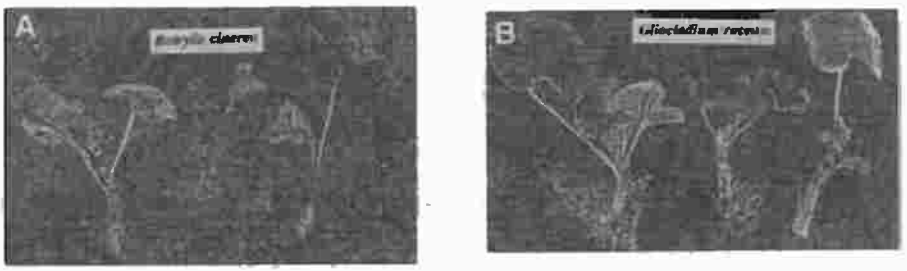
كانت هناك عزلات من *Trichoderma sp.* من بين العزلات ذات الأداء المتميز المشابه لأداء *G.roseum* فى بعض العوائل. من بين هذه العزلات *T.koningii* فى نبات البيجونيا وأخرى فى نبات بخور مريم وثلاثة عزلات من *T.harzianum* فى الجيرانيوم. من بين عزلات الجنس *Stilbella* (هذا الجنس لم يذكر فى أى من الأبحاث على أنه يدخل كعامل مقاومة حيوية)، كانت هناك عزلة واحدة هى *S.aciculosa* كان لها اداء متميز فى نبات بخور مريم، الخيار والفلفل. كانت هناك مجموعات أخرى من الميكروبات عالية الفعالية فى نبات بخور مريم. هناك عزلة أخرى من *G.roseum* تعطى بثبات وقاية جيدة على الأوراق والسيقان ضد الجراثيم الكونيدية للفطر *B.cinerea*، ولكنها كانت أقل فعالية ضد الإصابة فى البتلات. تكون البتلات المستعمرة من قبل الفطر الممرض والمتعلقة مع المجموع الخضرى للنبات شكلاً مهماً وهائلاً من اللقاح للكائن الممرض فى بخور مريم، جيرانيوم، البيتونيا، الطماطم وعوائل أخرى. فى كثير من التجارب تم الحصول على مقاومة حيوية بطريقة سهلة، وذلك عن طريق معاملة الازهار ضد الجراثيم الكونيدية للفطر *B.cinerea* وأفضل من طريقة معاملة المجموع الخضرى ضد ميسيليوم الكائن الممرض فى

البتلات المريضة. فمثلا فى حالة نبات بخور مريم فإن معاملة الأزهار بالفطر *G.roseum* قبل الحقن بالكائن الممرض، ثم بعد ذلك استعمال البتلات كمصدر لقاح على المجموع الخضرى، تثبط الكائن الممرض فى الأوراق بنسبة اكبر من ٩٠ ٪، وبالمقابل كان هناك ٤٠ – ٥٠ ٪ فقط مقاومة تم الحصول عليها فى الأوراق المعاملة بالفطر المضاد، ثم حقنت بعد ذلك بالبتلات المستعمرة.

يختلف أداء الفطر *G.roseum* ضد الفطر الممرض *B.cinerea* اختلافاً كبيراً فى ازهار نباتات الزينة فى الصوبات الزجاجية. وفى حالات عديدة كان أدنى من كفاءة أفضل عزلات الجنس *Trichoderma* والمبيدات الفطرية القياسية. فمثلا *G.roseum* يثبط الفطر *B.cinerea* بحوالى ٤٩ ٪ و ٦٨ ٪ بالترتيب فى الازهار كاملة التفتح، والتى وصلت طور الشيخوخة فى نباتات البيجونيا، بالمقارنة مع ٩٥ ٪ و ٩٣ ٪ بالترتيب بالنسبة لعزلة من *T.koningii* و ٨٥ ٪ و ٩٥ ٪ بالنسبة لمادة Chlorothalonil كانت هناك اختلافات جوهرية بين عزلات الفطر *G.roseum* من البيجونيا، وسبعة عوائل أخرى عندما اختبرت ضد الفطر الممرض فى البتلات، ولكن ليس فى أوراق من نبات البيجونيا. أما فى بتلات نبات بخور مريم فإن الفطر *G.roseum* وعزلة أخرى من *T.koningii* ثبطت الكائن الممرض بحوالى ٧٥ ٪ و ٩٠ ٪ بالترتيب. فى بتلات الجيرانيوم فإن *G.roseum* و *T.harzianum* كانت ذات فعالية بنسبة ٣٢ الى ٤٤ ٪ و ٤٤ – ٨٦ ٪ بالترتيب. تبرقش البتلات المتسبب عن الفطر *B.cinerea* فى نبات الجربارة Gerbera قد خوض بنسبة اكبر من ٩٠ ٪ بواسطة الفطر *G.roseum* وبواسطة الفطر *T. harzianum* ولكن كفاءة التضاد، لا فى هذا ولا فى ذاك قاومت لفحة البتلات تحت بعض الظروف فإن الفطر *G.roseum* يثبط الكائن الممرض فى بتلات عوائل مختلفة بحوالى ٨٥– ٩٥ ٪. هناك عوامل أخرى مختلفة تؤثر على كفاءة المقاومة الحيوية للفطر *G.roseum*، منها، عمر الزهرة، التلقيح، درجة الحرارة، فترات الرطوبة، تركيز اللقاح وطريقة استعمال اللقاح (شكل رقم ١٧).

غالباً ما يستعمر الفطر *B.cinerea* بتلات ازهار الطماطم المتدلية كغذاء أساسى، والتى منها يخترق ثمار الطماطم الناضجة أو الخضراء إما مباشرة اوعن طريق مهاجمة اوراق الكأس الملتصقة بالثمرة اولا ثم يدخل الى الثمرة. عندما تحقن البتلات بالكائن الممرض بتركيز ٥ x ^{٥}١٠ جرثومة كونيدية/مل ثم تنبت هذه الجراثيم ونكون هيفات فإنها تتوجه

بالقرب وباتجاه الكأس الملتصق بالثمار الخضراء، وغالبا فإن جميع وريقات الكأس تصبح ملفوحة و ٩٥ ٪ من الثمار يتكشف فيها المرض (شكل رقم ١٨) . يمكن مقاومة لفحة الكأس وعفن الثمرة، كلية وبكفاءة عندما تعامل البتلات بالفطر *G.roseum* وذلك قبل حقنها بالكائن الممرض بمدة عدة ساعات (شكل ١٨) .



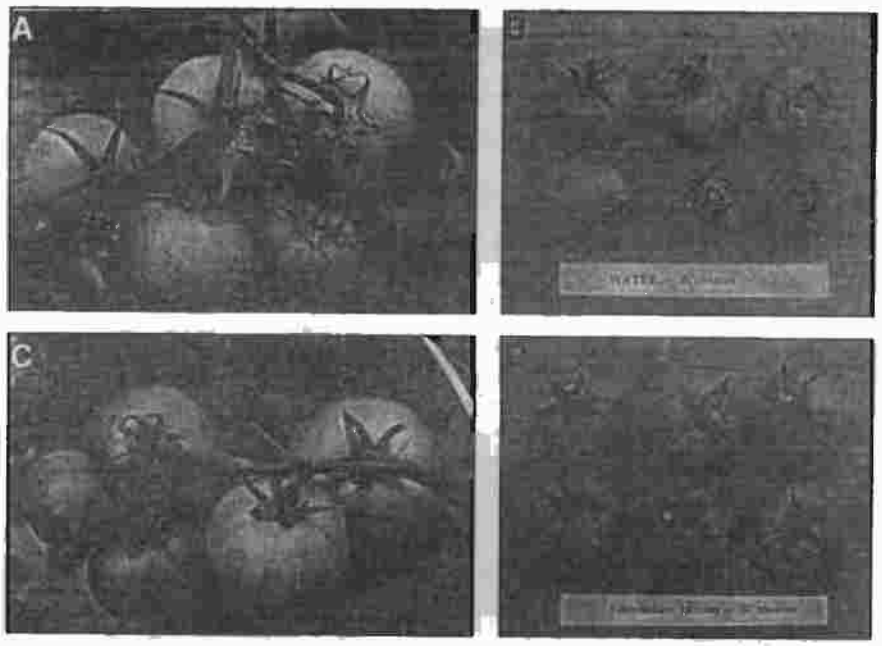
شكل رقم (١٧) المقاومة الحيوية للعفن الرمادى فى عقل الجيرانيوم باستعمال الفطر *G.roseum*.

A : عقل محقونة بالفطر الممرض *B.cinerea* فقط.

B : عقل محقونة بالفطر الممرض + الفطر المضاد.

جـــروح النبـــات

تعتبر جروح النبات مسرحاً آخر تلعب فيه عوامل المقاومة الحيوية دوراً فعالاً، وخاصة الفطر *G.roseum* . هذا الكائن المضاد يوقف بشدة الكائن الممرض *B.cinerea* فى عقل ونباتات الأم فى نبات الجيرانيوم (بعد فصل العقل عن النبات الأم وإحداث جروح فيه)، وفى جروح سيقان الطماطم عند ازالة الأوراق السفلية، وفى جروح ضربة الشمس على أوراق *Exacum affine* (١٩) . فى حالة نبات الجيرانيوم، فإن غمر العقل الحديثة التى فيها جروح ناتجة عن النهش أو إزالة الاوراق، فى المعلق الجرثومى للفطر *G.roseum* بتركيز $^{٧}١٠$ جرثومة كونيدية / مل ،يقاوم العفن الرمادى كلية تقريبا، هذه الكفاءة تشابه أو أحسن من التى يحدثها المبيد Iprodione . العقل المعاملة بالفطر *G.rosum*، يتكشف منها جذور سليمة.



شكل رقم (١٨) وقاية الكأس والثمار فى الطماطم ضد الفطر *B.cinerea* فى بتلات طماطم مستعمرة من قبل الفطر المضاد ،عن طريق معاملة البتلات بالفطر *G.roseum*.

A : كأس مصابة باللفحة ناشئة عن بتلات مريضة

B : عفن الثمار متكشف من كأس مريضة

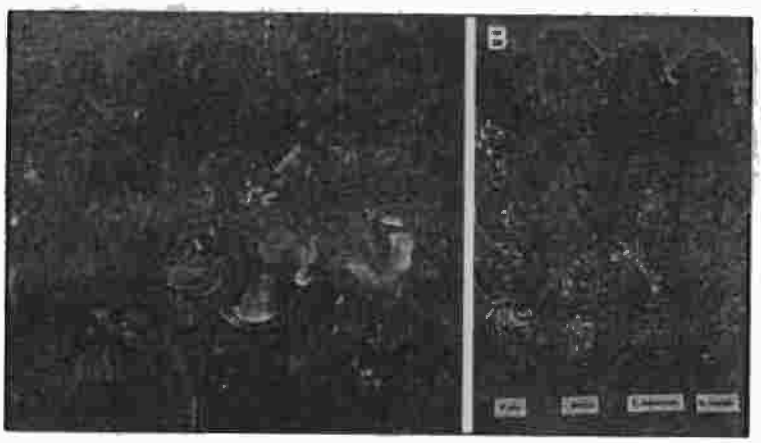
C : كأس سليمة محفوظة بواسطة الفطر *G.roseum* المستعمل على البتلات.

D : ثمار سليمة محفوظة بواسطة الفطر *G.roseum* ملتصقا مع البتلات.

بغزارة وتكون اكثر قوة من تلك التى عوملت بالمبيدات الفطرية، وبالمقابل فإن العقل التى حقنت بالفطر *B.cinerea* تتكشف عليها بقع كبيرة ويموت أكثر من ربعها بسرعة. أما فى الطماطم فإن استعمال الفطر *G.roseum* بتركيز $^{٧}١٠$ جرثومة كونيدية/ مل مضافاً الى الجروح الناتجة من إزالة الاوراق، يحفظ الساق لعدة شهور بعد الاستعمال. أمكن إعادة عزل الفطر *B.cinerea* من ٧٠٪ من مناطق الجروح التى حدثت، بعد إزالة الأوراق عندما حقنت هذه لجروح الحديثة بالكائن الممرض (بتركيز $٥ \times ^{٥}١٠$ جرثومة كونيدية/ مل) فقط،

ولكن من أقل من ٢ ٪ من الجـروح التى عـوملت بالفطر *G.roseum* قبل الحقن بالكائن الممرض بمدة ٢٤ ساعة.

يستمر بقاء الفطر *G.roseum* بشكل غير عادى فى السيقان الحية، وأمكن إعادة عزله من اكثر من ٩٨ ٪ من مناطق الجروح بعد ثلاثة شهور من الحقن. كذلك فإن جروح ضربة الشمس فى اوراق *Exacum affine* تكون مناطق أكثر أهمية للاختراق بواسطة الفطر *B.cinerea*. إن معاملة الجروح التى تحدث صناعياً وتشابه جروح ضربة الشمس (باستعمال اللهب مثلا) وجروح ضربة الشمس الطبيعية باستعمال *G.roseum* (تركيز ٥ X ١٠^{٧} جرثومة كونيدية/ مل) يخفض شدة مرض العفن الرمادى المحدث بواسطة الفطر *B.cinerea* (تركيز ١٠^{٥} جرثومة كونيدية/ مل) بحوالى ٩٧ – ١٠٠ ٪.



شكل رقم (١٩) : النبات *Exacum affine*.

A : جروح متكونة من ضربة الشمس على الاوراق

B : المقاومة الحيوية للعفن الرمادى المتسبب عن *B.cinerea* فى النباتات ذات الجروح من ضربة الشمس.

بعد ثلاثة أسابيع من المعاملة بالكائن الممرض كان المرض شديدا فى الكنترول (أول صف على اليسار). كان متوسط الشدة فى النباتات المعاملة بمادة Iprodione او باستعمال الفطر *T.harzianum* الصفين الثانى والثالث بالترتيب. الصف الرابع على اليمين تظهر فيه مقاومة تامة للمرض باستعمال الفطر المضاد *G.roseum*.

العوامل المؤثرة على كفاءة G. roseum

١- طور نمو أعضاء العائل :

المرحلة التى تمر بها الاوراق ابتداءً من أول امتدادها فى المراحل الاولى من النمو، حتى الوصول الى طور الشيخوخة، بشكل عام، تكون ذات تأثير بسيط على فعالية الفطر *G.roseum* ضد الفطر الممرض *B. cinerea*، فى المجموع الخضرى لكل من الفراولة، البيجونيا ونبات بخور مريم. الأوراق التى بدأت فى الامتداد والتوسع فى البيجونيا وبخور مريم، تكون أقل قابلية لاستقبال الفطر الممرض والتى تقاوم فيها الاصابة (اذا حدثت) حيوياً بصعوبة او يصعب قياس نجاح المقاومة الحيوية فيها. فى العوائل الثلاثة المذكورة كانت كفاءة المقاومة الحيوية ٣٠ – ٧٠ ٪ أقل فى الاوراق فى سن الشيخوخة، بالمقارنة مع الأوراق التى فى مرحلة قبل الشيخوخة، وتكون صفراً تماماً فى الأوراق الميتة.

المقاومة الحيوية للفطر *B.cinerea* فى الأزهار تمثل تحدياً خاصاً بسبب تعقيد نمو، تكشف وتركيب الازهار. وبشكل عام فإن الأعضاء المختلفة فى الازهار المتكشفة والتى فى 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 فى دراسات على الازهار المتفتحة جزئياً، كاملة التفتح والازهار فى طور الشيخوخة لنبات البيجونيا التى قد حقنت بالكائن الممرض (10^6 جرثومة كونيدية/ مل) ثم الحقن بالكائن المضاد بعد ٢٤ ساعة (إما بالفطر *G.roseum* او الفطر *T.koningii* بتركيز 10^7 جرثومة كونيدية/مل) وجد أن هذه التركيزات من الكائن المضاد لا تؤثر على القابلية للإصابة بالفطر الممرض فى الأطوار المتتابعة لتكشف الزهرة. وجد أن الفطر *G.roseum* يثبط الكائن الممرض بحوالى صفر فى الأزهار المتفتحة جزئياً، ٤٩ ٪ فى الأزهار كاملة التفتح، ٦٨ ٪ فى الأزهار التى فى طور الشيخوخة، بينما *T.koningii* كانت مقدرته على التثبيط بحوالى ٩٣– ٩٥ ٪ فى المراحل الثلاثة.

٢- تركيـــز اللقـــاح

إن معرفة تركيز اللقاح للفطر *G.roseum* وعلاقاتها فى مقاومة الفطر الممرض *B.cinerea*، من الأساسيات المهمة لوضع أسس مناسبة لتوصيات استعمال المقاومة الحيوية فى امراض المحاصيل. كما هو متوقع فإن العلاقات تختلف كثيراً مع كل من المحصول، نوع وعمر العضو النباتى، تركيز الكائن الممرض، ظروف المناخ (الطقس المحيط بالنبات) وعوامل أخرى. وعن طريق الاستدلال فإن أفضل تركيز من الفطر *G.roseum* 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 اللقطاح للفطر *G.roseum* الذى يعطى مقاومة كافية ضد الفطر الممرض *B.cinerea* فى المحصول، هو مطلب حتمى يجب معرفته.

الدراسات التى أجريت تحت ظروف متحكم بها، زودتنا بصورة منظورة لمتطلبات اللقاح من الفطر المضاد لمقاومة الفطر الممرض فى عديد من المحاصيل. عند حقن المجموع الخضرى والأزهار فى البيجونيا ونبات بخور مريم بتركيزات مختلفة من الفطر الممرض (من صفر الى $١٠^{٦}$ جرثومة كونيدية/مل) ومن الفطر المضاد بتركيزات (من صفر الى $١٠^{٨}$ جرثومة كونيدية/ مل)، فى جميع الاتحادات تم الحصول على مقاومة حيوية جيدة، اساسا عندما كان تركيز الكائن المضاد مشابهاً أو أكثر من ذاك التركيز فى الكائن الممرض. فى دراسة مماثلة على العليق ، فإن المستويات العالية من المقاومة (٩٠- ١٠٠ ٪) قد تم الحصول عليها فى الأوراق لجميع الاتحادات من $١٠^{٣}$ الى $١٠^{٦}$ جرثومة كونيدية من الفطر الممرض/ مل و $١٠^{٤}$ الى $١٠^{٨}$ جرثومة كونيدية/ مل من الفطر المضاد، أما فى السيقان، الأسدية والمياسم، فقط عندما يكون تركيز الكائن المضاد ١٠ أو ١٠٠ ضعف أكثر من ذاك الذى للكائن الممرض. ومن غير المتوقع فإن الفطر المضاد على تركيز $١٠^{٨}$ جرثومة كونيدية/ مل غالباً ما تكون أقل فعالية من تركيز $١٠^{٧}$ او $١٠^{٨}$ جرثومة كونيدية فى الاسدية والمياسم، لوحظت أيضاً حالة واحدة فى المجموع الخضرى لشتلات البيسيه السوداء فى غرف الانبات. يبدو واضحاً أنه ليس من المهم زيادة التركيزات المثلى للفطر المضاد للمقاومة الحيوية فى المحاصيل، خاصة عندما تكون الظروف ملائمة لبقاء الكائن المضاد. فى

الصوبات الزجاجية وغرف الإنبات، فإن استعمال تركيز $^{7}10$ جرثومة كونيدية/مل من الفطر المضاد يثبط بشدة الفطر الممرض بتركيز $^{6}10$ جرثومة كونيدية/مل فى مختلف أعضاء نبات البيجونيا، بخور مريم، *Exacum*، جيرانيم، الجيربارا، الخيار، الفلفل، العليق، الفراولة، الطماطم وعوائل اخرى كثيرة. فى كل حالة فإن التركيز من الكائن الممرض كان كافياً ليحدث مرضاً خطيراً ومستمراً فى غياب الكائن المضاد.

إن تركيز اللقاح من $^{6}10$ الى $^{8}10$ جرثومة كونيدية/ مل من الفطر المضاد عادة، يعطى مقاومة جيدة للفطر الممرض فى المحاصيل فى الحقل وفى الصوبا الزجاجية. اللقاح المحتوى $^{6}10$ جرثومة كونيدية/ مل من الفطر المضاد عادة ما يكون كافياً فى الفراولة، البيجونيا، وبخور مريم. أما تركير $^{7}10$ جرثومة كونيدية/مل من الفطر المضاد يعطى نتائج أفضل فى العليق، أما تركيز $^{7}10$ – $^{8}10$ كان أقرب للوضع الأمثل للمقاومة الحيوية فى البيسيه السوداء.

فى تجارب أخرى وجد أن أستعمال الفطر *G.roseum* بتركيز ٥ x $^{6}10$ جرثومة كونيدية/ مل تثبط مرض لفحة الأوراق المتسبب عن الفطر *B.squamosa* على البصل فى الحقل بنسبة ٥٠ – ٥٨٪.

٣- الحـــــرارة

أجريت دراسات على الحرارة وعلاقتها مع فعالية المقاومة الحيوية التى يقوم بها الفطر *G.roseum* ضد الفطر الممرض *B.cinerea* فى خمسة عوائل. بشكل عام فان مستوى المقاومة الحيوية يكون عالياً على ٢٠ – ٢٥°م ، وأيضا على ٣٠°م فى العوائل التى فيها يمكن الحصول على قياس للاصابة، ولكنها كانت تدريجياً أقل على ١٥ و ١٠° م. درجات الحرارة المنخفضة تقلل المقاومة الحيوية بشكل هامشى (الحد الادنى) فى الاوراق فى نباتات الفراولة والبيجونيا وفى أسدية نبات العليق، ولكنها تقلل كفاءة المقاومة الحيوية بشكل متوسط فى اوراق العليق، بخور مريم والجيرانيوم وفى بتلات البيجونيا، ولكن بشكل عال وواضح فى بتلات بخور مريم والجيرانيوم. التأثيرات المختلفة لدرجة الحرارة على المقاومة الحيوية فى الاعضاء المختلفة فى العائل كانت واضحة فى أربعة عوائل. ومن الدراسات المستفيضة على

عزلات الفطر المضاد على ازهار بخور مريم والجيرانيوم، تبين أن للعائل الدور الاساسى فى المقاومة الحيوية وليس لعزلة الكائن المضاد، على درجات الحرارة المنخفضة.

٤ - الرطـــوبة الحـــرة

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 *G.roseum*، 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 *G.roseum* فى الإنبات على المجموع الخضرى الجاف فى بادرات البيسيه السوداء فى مراقد 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 عوائل أخرى، فإن فترة الرطوبة ضرورية خلال الساعات الأولى من استعمال الفطر المضاد للحصول على أفضل نمو وأفضل مقاومة حيوية. أما فى الدراسات الحقلية، تبين أن فترة الامطار القصيرة (سواء 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، وتؤثر بالتالى على كفاءة المقاومة الحيوية.

من ذلك يتبين أن الرطوبة العادية ضرورية لنجاح المقاومة الحيوية بالفطر المضاد المذكور سابقا، 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 *G.roseum* مع أنسجة العائل:

تكون الجراثيم الكونيدية للفطر *G.roseum* قادرة على الإنبات فى توفر الرطوبة على سطح العائل وتنتج أنبوبة إنبات بسيطة، وهيفا سطحية وتخترق الأوراق، السيقان، البتلات

والاسدية لأنواع مختلفة من النباتات. التكشف السطحى 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 ميكروميتر) والتى تستطيل بسرعة بعد ١٢– ١٦ ساعة على الأسدية والسيقان، بالترتيب وببطء بعد ١٢– ٢٤ ساعة على الأوراق. تتكشف تفرعات قصيرة (١– ٥ ميكروميتر) على أنابيب الإنبات، وهيفات بعد ١٦ ساعة وتخترق أنسجة العائل مباشرة. ومن الملاحظ أن الحوامل الكونيدية العنقودية (خصلية) والسوارية للفطر المضاد *G.roseum* تتكشف من هيفات سميكة سطحية على السيقان، الأسدية والأوراق بعد ٣٢– ٧٢ ساعة، وتنتج أعداداً كبيرة من الجراثيم الكونيدية بعد ٤٠– ٧٢ ساعة. وبالتالى 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 والازهار، وبالتالى يمكن أن يشارك فى مؤازرة مقاومة الفطر الممرض *B.cinerea* فى المحصول.

يكون تكشف الفطر *G.roseum* بعد اختراقه المجموع الخضرى فى النبات والأزهار، بشكل عام غير واضح، سواء بقى محدوداً ومقتصراً 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 (محليا) على الأقل لمدة ثلاثة شهور فى سيقان نباتات الطماطم النامية بقوة، إلا أنه يستعمر بشدة الاوراق فى سن الشيخوخة وكذلك أزهار الفراولة، البيجونيا، بخور مريم، والجيرانيوم وغالباً ما يتجرثم خلال يومين بعد موت الأنسجة. بينما الأنسجة فى طور الشيخوخة تشجع بشكل واضح الكائن المضاد بأن يستعمرها، إلا أنه أيضاً يستعمر العناصر الوعائية فى نباتات فول الصويا النامية بقوة ونباتات البرسيم الاحمر. لقد دلت جميع التجارب على أن أنسجة النبات العائل التى تحقن بالفطر المضاد تبقى خالية من الاعراض المرضية، إلا أنه فى حالات نادرة، عند استعمال لقاح مكثف من الميسيليوم تظهر بقع على السويقة الجنينية السفلى فى الفاصوليا.

طرق عمل الفطر *G.roseum*

يعتمد هذا الفطر فى عمله فى المقاومة الحيوية ضد الفطر الممرض *B.cinerea* على المنافسة على المواد الغذائية وعلى عملية التطفل الفطرى Mycoparasitism . تكون المنافسة الغذائية مهمة على المجال الورقى فى معظم نباتات الزينة. يبدو بشكل واضح ان الكائن المضاد يستعمر ويستغل الأنسجة المتقدمة فى السن بسرعة أكبر مما يعمله الكائن الممرض *B.cinerea*، وكذلك فانه يعوق استعمار الأنسجة من قبل الكائن الممرض. هذه الطريقة من العمل أساسية، بسبب أنها تشارك فى تثبيط اللقاح للفطر الممرض. ونظراً لأن الكائن المضاد متطفل فطرى على كل من الهيفات، الجراثيم، الاجسام الحجرية والاجسام الثمرية لكثير من الفطريات من ضمنها *B.cinerea*. مع أن جميع الدراسات كانت تثبت ظاهرة التطفل هذه معمليا على بيئة الآجار، إلا أن Sutton *et al* سنة ١٩٩٧ أثبت أن هذه العملية تتم فى الحقل على الاوراق فى نبات العليق.

ومن الجدير بالذكر أن بعض الدراسات أثبتت أن التفاعلات بين *G.roseum* 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 أنبوبة الانبات للفطر *B.cinerea*، ولكن نادراً ما يتطفل على الكائن الممرض. وعلى أية حال فإنه 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 الانبات او هيفات الفطر المضاد. يكون التضاد واضحاً على السيقان على شكل تثبيط معتدل لنمو أنبوبة الانبات وتطفل قوى على الفطر الممرض بواسطة الفطر المضاد. خلال توفر الرطوبة العالية (٣٢– 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 داخليا أو خارجيا او السطحية او التى بين الخلايا، تدل على أن كثيرا 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 التى فى الحواجز للخلايا غير المتحطمة المتجاورة. وبشكل عام فإنه على سطوح الأسدية فإن الفطر المضاد لا يثبط إنبات،

نمو او إنتاج 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، كنظرية لتوضيح الاختلافات غير العادية فى تفاعلات الكائن المضاد مع الكائن الممرض على الانسجة المختلفة لنبات العليق.

بالإضافة الى التنافس والتطفل الفطرى، فمن المحتمل أن الفطر المضاد يضاد الفطر الممرض عن طريق التضاد الحيوى. ينتج الكائن المضاد مجموعة من المثبطات الفطرية وإنزيمات 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 الى المغذيات القريبة من الكائن الممرض، وأن هذا التنافس الغذائى يجب أن يكون داعماً للتضاد الحيوى. بينما الفطر *G.roseum* عنده قدرة لينتج على الاقل مادة مضادة فطرية من نواتج الميتابولزم، إلا أنه لايوجد أى دليل على دخول هذه المضادات الحيوية فى هذه المقاومة. ومما يؤيد ذلك أن الطفرات من الفطر المضاد التى تنتج مستويات عالية او متوسطة من نواتج التمثيل أو لا تنتج أبدا، لا تختلف فى كفاءتها فى المقاومة الحيوية ضد الفطر الممرض فى أوراق الفراولة. لايوجد اى دليل واضح على أن الفطر *G.roseum* يحدث مقاومة مستحدثة فى نباتات العائل.

هناك أنواع اخرى من الفطر *Gliocladium* تنتج مضادات حيوية مختلفة لها دور فى المقاومة الحيوية (شكل ٢٠) هذه المضادات هى:

١ – Viridin يفرزه الفطر *Gliocladium virens*

٢ – Gliotoxin يفرزه الفطر *G.deliquescens*

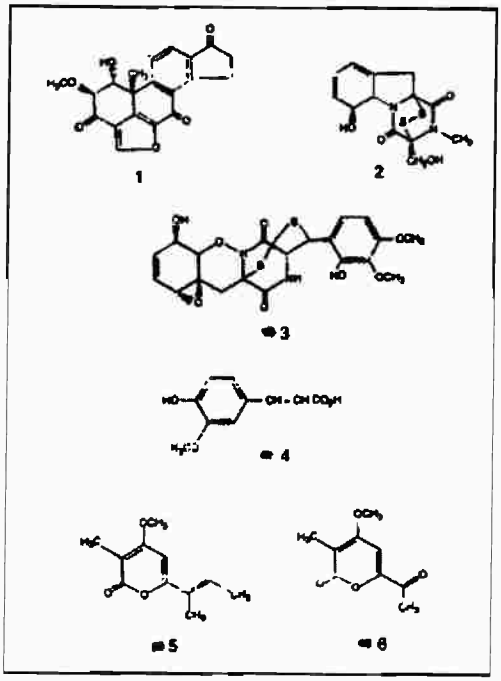
٣ – Gliovirin يفرزه الفطر *G.deliquescens*

٤ – Ferulic acid يفرزه الفطر السابق أيضا.

٥ – Viridin + Gliotoxin + dehydrogliotoxin يفرزه الفطر *G.flavafuscum*.

٦ – Pyrones,nectriapyrone يفرزه الفطر *G.vermoesenii*

٧ – Nectriapyrone + vermopyrone يفرزه الفطر السابق أيضاً.



شكل رقم (٢٠) : المضادات الحيوية التى تفرزها بعض أنواع الجنس *Gliocladium*.

١ – virdin
٢ – Gliotoxin
٣ – Gliovirin
٤ – Ferulic acid
٥ – dehydrogliotoxin
٦ – nectriapyrone

طرق استعمال الكائن المضاد G.roseum عمليا

حدث تقدم ملموس فى طرق تحضير اللقاح للكائن المضاد، ووقت استعماله وكيفية استعماله، وذلك للحصول على أعلى كفاءة فى المقاومة الحيوية باستعمال *G.roseum* ضد

الفطر الممرض *B.cinerea* على كثير من المحاصيل. يمكن الحصول على لقاح الفطر المضاد *G.roseum* بسهولة وقلة تكاليف، وذلك بتنمية الفطر على حبوب القمح أو النجيليات الأخرى. فى بعض المعامل يمكن الحصول على تركيزات عالية من الكائن المضاد (١ – ٥ x ١٠^{٩} جرثومة كونيدية / 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 والتى تنتج محصولا وفيرا من الجراثيم الكونيدية أكثر من إنتاج الحوامل الكونيدية ذات الشكل السوارى، حيث أن الحوامل الكونيدية السوارية تتكون عادة تحت ظروف الرطوبة العالية. بالإضافة الى الجراثيم الكونيدية فإن أجزاء الميسيليوم من الفطر *G.roseum* يمكن عزلها من حبوب القمح بعد ١٥ يوماً، حيث وجد أنها فعالة ضد الفطر الممرض *B.cinerea* فى الفراولة. الكونيديات المأخوذة من حبوب القمح يمكن تخزينها لمدة اكثر من سنة على حرارة ٣ – ٥° م، ولمدة ٣ شهور على حرارة ٢٠ – ٢٣° م دون اى فقد معنوى فى حيوية او كفاءة المقاومة الحيوية التى تحدثها، هذه المعلومات مهمة فى الإنتاج التجارى للكائن المضاد. قبل استعمال الكائن المضاد على المحاصيل، فإن الجراثيم الكونيدية لهذا الفطر يمكن أن تعلق فى ماء مضافا 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 *G.roseum* 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 وحداثة تكتشف باستمرار للاستعمال على الانسجة المستهدفة الخاصة. بالنسبة للجروح التى تحدث على عقل الجيرانيوم، تعامل بسهولة عن طريق الغمر السريع للعقل فى اللقاح، بينما الجروح الناتجةعن إزالة الأوراق فى الطماطم والخيار فى الصوبات الزجاجية، يمكن أن تعامل باستعمال الرشاشة اليدوية أو الفرشاة او قطعة قماش ماسحة. الوسائل التى تستعمل باستمرار لإزالة الأوراق السفلية، يمكن أن تستعمل لرش اللقاح على الجروح وتشارك فى فعالية هذه الطريقة. أزهار الفراولة والعليق يتم معاملتها بنجاح بالفطر المضاد *G.roseum* باستعمال النحل كعامل لنقل اللقاح.

دور نحل العسل في المقاومة الحيوية

يستعمل نحل العسل لنقل عوامل المقاومة الحيوية إلى الأزهار لمقاومة إصابة الأزهار بالكائن الممرض. فى الدراسات الحديثة التى تمت سنة ١٩٩٢ بواسطة Peng *et al* فى كندا وفى سنة ١٩٩٦ بواسطة *Yu* أيضاً فى كندا، تبين أن نحل العسل *Apis mellifera*، عامل نقل فعال للقاح الفطر المضاد *G.roseum* الى ازهار الفراولة والعليق. كذلك النحل الطنان *Bombus impatiens*، عامل نقل فعال لنفس الفطر لازهار العليق.

تتم عملية استعمال النحل، وذلك عن طريق تشكيل مسحوق من جراثيم الفطر المضاد. يوضع هذا المسحوق فى معلق مائى سميك ويعلق هذا المعلق فى خلية النحل أمام مدخلها. المواد التى يخلط بها هذا التركيب المحتوى على الجراثيم، لكى تستعمل من قبل نحل العسل أو النحل الطنان تتكون من تشكيلات مختلفة من المواد الغذائية شبه الجافة، مخلوطة مع بودرة التلك مع نخالة الذرة. كما سبق وذكرنا يعلق المعلق فى طريق النحلة لكى تلامسه أثناء خروجها من الخلية حيث يتلوث جسمها بهذه المواد التى تحمل جراثيم الفطر. عند إجراء اختبارات على النحل الذى يخرج من الخلية ويمر على هذا التركيب الذى يحوى ٥ x $١٠^{٨}$ الى ١ x $١٠^{٩}$ وحدة تكوين مستعمرات من الفطر المضاد *G.roseum*/ غرام، وجد أن كل نحلة تحمل مئات الألوف من الوحدات مكونة المستعمرات من الكائن المضاد. تستطيع كل نحلة أن تعطى ٣٠٠- ٢٧٠٠٠ وحدة تكوين مستعمرات لكل زهرة فى الفراولة، و ٦٠٠ - ٢١٠٠ وحدة تكوين مستعمرات لكل زهرة فى العليق، بينما فى النحل الطنان، تستطيع كل نحلة أن تنقل ٤٥٠- ٢٤٠٠ وحدة تكوين مستعمرات لكل زهرة فى العليق. إن كمية اللقاح التى تحملها نحلة العسل او النحلة من النوع الطنان تكون لقاحاً كافياً للمقاومة الحيوية للفطر الممرض *B.cinerea* فى بتلات الازهار والاسدية فى أزهار الفراولة وأزهار العليق، بينما ثمار العليق من الصعوبة بمكان، أن تكون كمية الجراثيم الواصلة اليها كافية للمقاومة الحيوية للفطر الممرض، وذلك بسبب أن النحل لا يزور هذه الثمار كثيرا حتى يضع عليها جراثيم الفطر المضاد *G.roseum*، عدا عن ذلك فإن الكائن الممرض يمكن أن يخترق الثمار الصغيرة مباشرة بالإضافة لمقدرته على اختراق بعض الازهار.

إن كفاءة النحل كعامل ناقل لعوامل المقاومة الحيوية، يمكن أن تتأثر بمصادر الرحيق الموجود فى مصادر أخرى خارج النبات المستهدف والموجود فى نباتات أخرى، وبالتالى فإن النحلة تذهب الى تلك المصادر وتنخفض أعداد الجراثيم التى تحملها من الفطر المضاد

نظراً لاحتكاكها مع أزهار غير الأزهار المستهدفة. كذلك تتأثر كفاءة النحلة فى المقاومة الحيوية بالفترة التى تبقى فيها الزهرة متفتحة وجاهزة لاستقبال النحلة، وبالظروف الجوية وبالمكان الذى تتواجد فيه خلايا النحل ومدى بعدها عن المحصول المستهدف. هناك نباتات كثيرة لديها خاصة جذب النحلة بسهولة بعيداً عن أزهار الفراولة، ولكن نبات العليق فيه مصدر رحيق مناسب للنحلة تنجذب اليه بسهولة بغض النظر عن وجود المغريات الأخرى من الأزهار المختلفة. إن النحل الطنان يتعامل باستمرار مع كلا المحصولين، وعلى العكس من نحل العسل فإن النحل الطنان يكون اكثر نشاطاً حيث يطوف باحثاً عن غذائه فى الظروف الجوية الباردة (٦ – ١٦° م). عندما تكون الظروف ملائمة، فإن النحل كعامل ناقل للفطر المضاد له فائدة كبيرة من حيث كونه ينقل كل يوم اللقاح الى الازهار المتفتحة باستمرار. إن التوافق بين اعطاء اللقاح بواسطة النحلة وحدوث تلقيح أزهار العائل بالنحلة عملية سهلة فى كثير من المحاصيل.

إن فعالية استعمال النحل، فى نقل جراثيم الفطر المضاد على بتلات الازهار، بشكل عام يثبط وجود الفطر الممرض *B.cinerea* على البتلات والأسدية والثمار بكفاءة تشبه استعمال اللقاح رشاً . فى بعض الحالات تكون هذه الكفاءة أفضل من استعمال طريقة الرش، وذلك لان الجراثيم المستعملة فى طريقة الرش يتسرب نسبة كبيرة منها مع المحلول، اما باستعمال النحل فإن نسبة الجراثيم تبقى مركزة فى الزهرة، وتزداد باستمرار كلما زادت مرات زيارة النحلة للزهرة يوميا. إذا كانت الظروف ملائمة فإن النحلة تضع (٣,٦ – ٣٢) x ١٠^{٤} وحدة تكوين مستعمرات من الفطر المضاد على الزهرة يومياً، وإذا كان مصدر اللقاح يحوى جراثيم بتركيز عال (٥ x ١٠^{٨}) وحدة تكوين مستعمرات فإن النحلة يمكن أن تضع (٩ – ١٨٠) x ١٠^{٤} وحدة تكوين مستعمرات من الفطر المضاد على الزهرة يومياً.

الفطـــر Gliocladium virens

هذا الفطر يعزل من التربة. وله تأثير مضاد لكثير من الكائنات الممرضة، حيث يتطفل على أربعة أنواع من الفطر *Phytophthora* الكامنة فى التربة. هذه الأنواع هى:

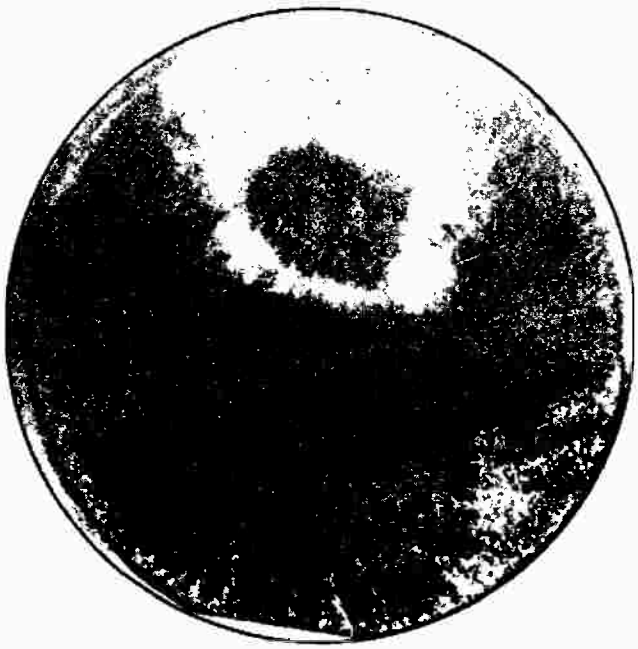
1 - Phytophthora cinnamomi.

2 - P. cactorum

3 - P.fragariae

4 - P.nicotianae

فى التجارب المعملية تبين أن الفطر *G.virens* يثبط نمو الفطر *P.cinnamomi* فى المزرعة المزدوجة فى أطباق بترى فى المعمل (شكل رقم ٢١).



شكل (٢١) : يبين تثبيط نمو الفطر *Phytophthora cinnamomi* (فى الاعلى) بواسطة الفطر المضاد *Gliocladium virens* فى المزرعة المزدوجة. يلاحظ النمو غير المتناسق للفطر الممرض *P.cinnamomi*.

III: الجنس Cladorrhinum

مقـــــدمة:

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

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

تنمو مستعمرات هذا الفطر وتنتشر بالعرض وذات خصل شعرية ولها ميسيليوم هوائى وتكون ذات لون رمادى إلى أرجوانى مصفرة ذهبية، والتى أحيانا تشكل عناقيد من الهيفات الخضرية الشفافة. الجراثيم الكونيدية غير واضحة، وتأخذ الشكل الإصبعى أو الكروى، وذات حجم (٣– ٣,٥) *x* (٢,٥ – ٣) ميكروميتر. يمكن أن يعزل الفطر من التربة او من Buck-wheat وقد وصف الفطر بأنه من ساكنات التربة، إلا أنه من الصعوبة عزله من التربة نظرا لصعوبة إنبات الجراثيم الكونيدية على البيئات الغذائية المتوفرة.

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

تأثير الفطر *Cladorrhinum* على نمو الفطر رايزوكتونيا

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

وجد أن اللقاح المكون من النخالة للعزلة *CF-1* من الفطر *C.foecundissimum* المحضنة لمدة ١٧ يوماً، لا تخفض مدة البقاء الحى للكائن الممرض *R.solani* على بذور بنجر السكر الملوثة بالفطر *R.solani* والمزروعة فى تربة لومية رملية *(LS)* او لومية رملية طينية *(SCL)*. لكن اللقاح المحضن نفسه لمدة ٢٣ يوماً منع نمو الكائن الممرض من الانتقال من بذور البنجر الى التربة. كذلك قد تم إيقاف النمو الترممى للفطر *R.solani* المضاف كمخلوط مع مجروش الذرة على المزارع بدون تربة soilless، أيضا قد تم إيقافه بواسطة العزلة *CF - 1* فى أربعة أنواع من الاراضى. كذلك هناك أربع عزلات أخرى من الفطر المضاد، وهى: CF-1 ,AT CC - 62373, CBS- 181- 66, CBs- 182- 66، كلها تمنع النمو التطفلى للفطر *R.solani* فى أراضى *LS* عندما يكون لقاح الكائن الممرض موجوداً فى مخاوط Soilless ومزوداً بمجروش الذرة. السلالات ذات العمر ٣٣ يوماً من السلالة *CF-1* والسلالة ATCC- 62375 منعت سقوط البادرات فى بنجر السكر المتسبب عن الفطر *R.solani* فى أراضى *SL* بعد أربعة أسابيع من النمو. أما استعمال السلالة *CF-1* فإنه ادى الى زيادة أعداد النباتات السليمة أكبر من ٩٠٪ أعلى من تلك المزروعة فى الكنترول. وعلى النقيض من ذلك فإن استعمال العزلات *CBS- 181- 66 CBS- 182- 66* أدى إلى زيادة اعداد النباتات السليمة بنسبة أقل من تلك المزروعة فى تربة ملوثة بالكائن الممرض. العزلات المحضرة والمخلوطة مع النخالة مثل CF-1 و ATCC- 62373 منعت سقوط البادرات فى الباذنجان والفلفل فى مخلوط بدون تربة Soilless، واعتماداً على معدل اللقاح المستعمل يؤدى ذلك الى زيادة النباتات السليمة بالمقارنة مع تلك المزرعة فى مخلوط دون تربة، خاليا من الكائن الممرض (جداول ٣٤، ٣٥، ٣٦).

جدول رقم ٣٤ : البقاء والنمو الترممى للفطر *R.solani* العزلة (R - 23) فى تربة LS و SCL مع تحضيرات الفطر المضاد على النخالة بأعمار مختلفة من السلالة ا -CF.

نوع التربة	عمر اللقاح بالأيام	بقاء الفطر الممرض فى بذور بنجر ملوثة (دليل الاستعمار)	النمو الترممى للفطر الممرض من بذور بنجر ملوثة فى التربة (دليل الاستعمار) .
لومية رملية (LS)	الفطر الممرض لوحده	٤,٤	٣,٦
	نخالة 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 طينيةSCL	الفطر الممرض لوحده	٤,٣	٤,١
	نخالة فقط	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 تحضيرات النخالة (١٪ وزن/ وزن)الى تربة ملوثة بالفطر *R.soloni*. دليل الاستعمار: يدل على نمو الفطر الممرض على سطح اجار محيط ببذرة بنجر السكر حيث أن:-

صفر = لا يوجد نمو ٠ ١ = نمو على شكل خيوط قليلة . ٢، ٣، ٤، ٥ = ٢٥، ٥٠، ٧٥، ١٠٠ ٪ من السطح المحيط بالبذرة مغطى بالهيفات بالترتيب

جدول رقم (٣٥): النمو التطفلى للفطر الممرض *solani* العزلة *(R - 23)* من لقاح مجروش الذرة المخلوط مع مواد غير عضوية فى تربة لومية رملية مضافاً إليها تحضيرات الفطر المضاد *C.foecundissimum* النامى على النخالة ، والمكون من أربعة عزلات.

العزلة	النمو التطفلى للفطر الممرض دليل الاستعمار
R.solani 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 تحضيرات النخالة ١ ٪ وزن/ وزن إلى التربة الملوثة بالكائن الممرض. دليل الاستعمار كما فى الجدول السابق.

جدول (٣٦) : النباتات السليمة من الباذنجان والفلفل المزروعة فى 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.

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

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 اضيف الى الكائن الممرض (زراعة بدون تربة ملوثة بالفطر) بمعدل ٠,٧ ٪ وزن/ وزن بالنسبة لتجارب الباذنجان و ٢,٦ ٪ وزن/ وزن لتجارب الفلفل.

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 فى المقاومة الحيوية لبعض امراض النبات، فهو يثبط ذبول الفير تسليم فى الطماطم، الباذنجان والبطاطس، ويتطفل على كل *Sclerotium Sclerotinia , R.solani, Sclerotium rolf-sii.* من وبشكل عام فان الميكانيكية المستعملة من قبل هذا الكائن المضاد فى المقاومة الحيوية ضد الفطريات الممرضة النباتية، تشمل التطفل الفطرى Mycoparasitism، التضاد الحيوى، التنافس والمقاومة المستحثة.

يستعمل هذا الفطر الأنزيمات المحللة لجدار الخلية مثل Chitinase, B- 1,3 - gluca-nase, cellulase, فى التضاد الحيوى. وجد أن الفطر *T.flavus* يضاد الفطر *Verticillium dahliae* عن طريق التطفل والتضاد الحيوى، ووجد أيضاً أن الأجسام الحجرية الدقيقة Mi-crosclerotia للفطر الممرض *V.dahliae*، يمكن أن تقتل براشح مزرعة الفطر المضاد *T.flavus*. هذه السمية التى يظهرها راشح المزرعة يمكن أن تعزى الى فعل مادة Glucose oxidase. مع أن الفطر *T.flavus* ينتج عديداً من الإنزيمات المفرزة خارج الخلايا، إلا أنه لغاية ١٩٩٧ لم يحدد أى من هذه الانزيمات له الدور الأهم الذى يلعبه فى المقاومة الحيوية.

استعملت فى إحدى التجارب عشر سلالات عادية، وطفرتان من السلالات المقاومة للمبيد الفطرى بينومايل، من الفطر *T.flavus* ودرست مقدرتها على إفراز الإنزيمات المحطمة للجدار الخلوى ،وهى Chitinase و B- 1,3 - glucanase و Cullulase ودورها فى 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 الاخرى. 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 الفطرى مثل Glucose - oxidase حيث إن هذه المادة تعوق إنبات ونمو هيفات الفطر، وتسبب اللون الأسود فى الأجسام الحجرية الدقيقة Microsclerotia المتكونة حديثا. الجدول (رقم ٣٧) 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 ٣٧). أما عن علاقة الانزيمات وتثبيط المرض فهو واضح فى جدول (رقم ٣٨). اما 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 ٢٢). وقد وجد أن السلالة TF1-R6 لها قدرة عالية على التطفل الفطرى، ووجد أنها تستعمر ٦٣ ٪ من الأجسام الحجرية للفطر الممرض، بينما السلالات TF- 62 و TF- 46 لم تستعمر اى جسم حجرى.

كانت تجارب الصوبا الزجاجية تجرى كالآتى:

– تحضر أوعية بلاستيكية قطر ١٠ سم، وتملأ بحوالى ٣٥٠ غرام تربة رملية، ويزرع فى كل وعاء خمس بذور من الفاصوليا. كانت تحضر أجسام حجرية جافة للفطر *S.rolfsii* وتنقع فى المعلق الجرثومى للفطر المضاد *T.flavus* بتركيز ^{7}١٠ 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 الصوبا الزجاجية على حرارة ٢٥ – ٣٠°م تقدر أعراض المرض (عفن الساق) كل يوم لمدة ثلاثة اسابيع بعد الانبات.

جدول رقم ٣٧ : النشاط الإنزيمى ونشاط سلالات T.flavus

ضد الفطرين *S.rolfsii* و *V.dahliae*.

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

ملاحظات على الجدول:

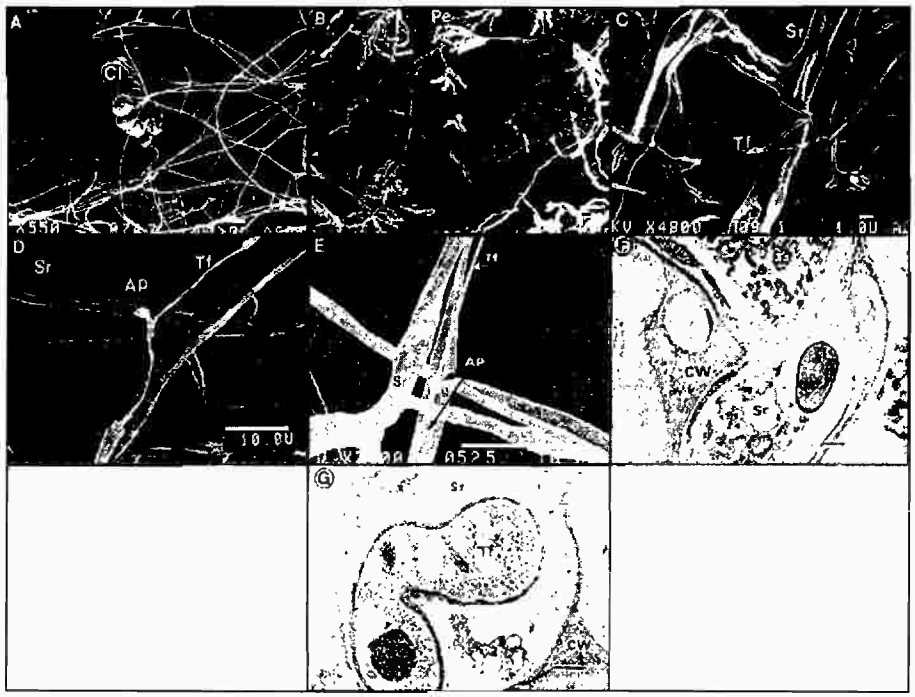
Chitinase = مكرومول من N-acetyl glucoseamine / ساعة / ملغم من البروتين.

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

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

نشاط التضاد الحيوى للفطر *V.* dahliae = أعلى تخفيف من راشح المزرعة الذى يثبط إنبات الأجسام الحجرية الصغيرة للفطر كلية.

فى دراسة فسيولوجية على الفطر *T.flavus*، وجد أن أفضل نمو خضرى وإنتاج للهيفات 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 للهيفات على



شكل رقم (٢٢) :

صورة بالميكروسكوب الإلكترونى تظهر تطفل الفطر T.flavus على الأجسام الحجرية للفطر *S.rolfsii*.

A : تحضين الأجسام الحجرية المحقونة فى الظلام للحث على الدورة الجنسية للفطر T.flavus وتكوين الأجسام الثمرية (Cl).

B : تحضين الأجسام الحجرية المحقونة تحت الإضاءة المستمرة يؤدى الى النموات الخضرية، وتكوين بنسيليا عديدة (Pe).

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

D +E = على طول هيفات *T.Flavus* فإن معظم مناطق التلامس مع S.rolfsii تنتفخ وتظهر مفصلية. كذلك أنبوبة الاختراق تظهر أيضاً منتفخة مثل تركيب عضو الالتصاق (Ap).

F + G = يلاحظ هيفا *T.flavus* تخترق الجدر الخلوية السميكة (CW) فى الأجسام الحجرية للفطر *S.rolfsii* متبوعاً بتحطيم عضيات خلية العائل وإختفاء محتويات السيتوبلازم.

مقياس الرسم = ١ ميكروميتر.

السكريات الأحادية. اما إنتاج الجراثيم الاسكية فيتم بعد ٦ أسابيع من النمو على بيئة صلبة وتحضينها على ٣٧° م. وجد أن أفضل مصدر غذائى هو السكريات القليلةالتسكر oligosac-charides؛ حيث تعطى ٢,٩ x ١٠^٨ جرثومة/ ٥,٥ سم قطر بيئة فى أطباق بترى، أما Monosaccharides فتعطى ١,٦ أو ١,٤ x ١٠^٨ جرثومة / ٥,٥ سم قطر فى البيئة فى أطباق بترى. بالنسبة لمصدر الكربون، ليست هناك علاقة بين تكوين الجراثيم الإسكية والوزن الجاف للهيفا. أما المصادر المختلفة للنيتروجين فتعطى من صفر الى ١٠^٩ جرثومة اسكية لكل ٥,٥ قطر بيئة فى طبق بترى و ١٠^-٤ – ١٠^-٥ 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 الاسكية يزيد كلما زادت نسبة *C/N* من ٥ : ١ الى ٣٠ : ١، هذا التأثير يكون أكثر وضوحاً كلما كان *C:N* يزداد من ٥ : ١ الى ١٥ : ١. فى النسبة المنخفضة من *C:N* اقل من ١٥ : ١ فإن المعاملة بمادة hypoxan-thine كمصدر للنيتروجين يؤدى الى 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 العاملة تربتها بالجراثيم الاسكية الناتجة من مزرعة نامية على بيئة *PDA* بالمقارنة مع نباتات الباذنجان المعاملة تربته بالجراثيم الإسكية الناتجة من مزرعة نامية على بيئة بها hypoxan-thine + لاكتوز أو مالتوز. وبالتالى فإن مصادر الكربون والنيتروجين التى تزيد قليلا إنتاج الجراثيم الاسكية للفطر *T.flavus* تخفض كفاءة المقاومة الحيوية لذبول الفير تسليم بالمقارنة مع الجراثيم الإسكية الناتجة من بيئة PDA . (جدولان رقم ٣٨، ٣٩).

الجدول (٣٨) : العلاقة بين النشاط الإنزيمى فى راشح مزرعة سلالات الفطر T.flavus ومقدرتها على التطفل على الاجسام الحجرية للفطر S.rolfsii لخفض مرض عفن ساق الفاصوليا فى تجارب الصوبا الزجاجية.

Correlation	Coefficient	الإنـــزيم
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 ٣٧).

الأرقام معنوية من صفر على $P = 0.05$.

جدول رقم (٣٩) : العلاقة بين المقدرة على التطفل على الأجسام الحجرية للفطر S.rolfsii، والخفض فى 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

ثانيا : الأجنـــاس البكتيـــرية

I : الجنـــس Pseudomonas

مقـــدمة :

أفراد هذا الجنس بكتيريات على شكل عصيات مستقيمة، الى منحنية، ذات أبعاد (٠,٥ - ١) x (١,٥ - ٤) ميكرون، متحركة بواسطة سوط واحد او اكثر. 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 fluorescens* خاصة السلالة *CHAO*. والنوع الثانى *P.putida* والثالث *P.aevuginosa*.

الســـلالة *P.fluorescence CHAO*

هناك بعض السلالات من البكتيريا الوميضة *P.fluorescence* المستعمرة لجذور النبات، تستطيع أن تثبط أمراضاً نباتية مختلفة كامنة فى التربة، وبالتالى تزيد النمو وكمية الإنتاج فى المحاصيل الزراعية. يكون تثبيط الكائنات الممرضة التى تهاجم الجذور عن طريق إنتاج مواد تسمى مضادات ميكروبات او 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

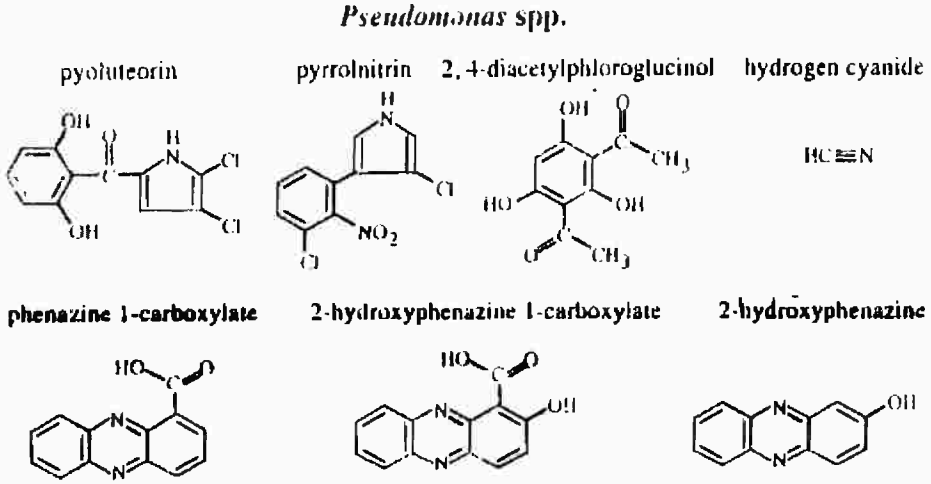
3 - 2,4 - diacetyl phloroglucinol (Ph1)

4 - Oomycin A

5 - Pyoluteorin (Plt)

6 - Pyrrolnitrin

يبين (شكل ٢٣) الصيغ الكيميائية لبعض هذه المركبات:



شكل (٢٣) : بعض المركبات الكيماوية التى تفرزها أنواع مختلفة من البكتيريا الوميضة، ولها دور فى تثبيط الأمراض النباتية.

أثناء نمو البكتيريا تحت ظروف محدودة فى كمية الحديد، فإن البكتيريا الوميضة ينطلق عنها وميض معين، وتنتج سايدروفورز خضراء مصفرة يطلق عليها Pyoverdines (Pvd) أو تسمى Pseudobactins. السايدروفورز تجعل الحديد تركيباً معقداً مع التربة؛ مما يجعله أقل توفراً للكائن الممرض. إن الدليل على دخول الـ (Pvd) فى تثبيط الأمراض، قد جاء من الدراسات التى أجريت على تنقية الـ Pvd (مقارنة مع مركبات الحديد المخلبية والطفرات السالبة لـ Pvd).

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

البكتيريا *P.fluorescens CHAO*، عزلت أصلاً من تربة مثبطة لمرض العفن الأسود لجذور الدخان، حيث وجد أنها تقى 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 فى تثبيط المرض، هذا ما وجده Ked & Defago سنة ١٩٩٦، أهم هذه النواتج هما HCN و Ph1، حيث يساعدان فى تثبيط العفن الأسود فى الدخان. كذلك وجد أن ال Ph1 يدخل فى تثبيط المرض الماحق (Take all) فى القمح. أما المركب Plt فقد وجد أنه يساهم أيضاً فى وقاية بعض أنواع النباتات من الاصابة بمرض سقوط البادرات المفاجيء، إلا أن هناك أدلة واضحة تبين أن دخول Pvd المذكور سابقا فى المقاومة الحيوية لأمراض الجذور غير أكيد. كذلك فان السلالة CHAO تنتج أيضاً Pch وSal، ولكن دورهما فى تثبيط الأمراض لم يدرس جيدا.

إن الجين الكروى المنظم Global activator والذى يطلق عليه *Gac A* فى السلالة المذكورة سابقا، ينظم سلوك عديد من نواتج التمثيل الثانوية من HCN، Ph1 و Plt وإنزيمات Tryptophan side-chain oxidase، وأنزيم Protease و *C* Phospholipase. إن جين تنظيم الاستجابة *Gac A* وجين تطابق الإحساس Lem A هما مكونان مهمان فى الجنس *Pseudomonas*. إن الجين Gac A غير مطلوب لإنتاج مركبات الحديد المخلبية فى CHAO، ولكن فى الطفرات السالبة لإنتاج *Gac A* من *P.fluorescens* سلالة *BL 915*، فأنها تفشل فى بناء عديد من عوامل المضادات الفطرية مثل HCN و Pyrrolnitrin، وتضعف كفاءتها فى تثبيط الأمراض. أيضاً وبطريقة مماثلة فإن الطفرات السالبة لإنتاج Gac A من السلالة CHAO، تكون مقدرتهاعلى تثبيط عفن الجذر الأسود فى 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 فى التربة. تنتج البكتيريا الوميضة مواد مضادة ميكروبية ذكرناها سابقاً، والتى كلها ضرورية لتثبيط المرض، إلا أن هناك مشتقات من السلالة *CHAO* ذات طفرة فى الجين الكروى المنظم (Gac A) والذى يعد غير قادر على إنتاج Phl، Plt، HCN، وهذا يفشل فى وقاية نباتات ذات الفلقتين مثل Cress، والخيار ضد مرض سقوط البادرات المتسبب عن الفطر *Pythium ultimum*. وبالمقابل فإن الطفرات السالبة لإنتاج Gac A تستطيع أن تقى نباتات ذات الفلقة الواحدة وخاصة النجيليات مثل القمح والذرة ضد سقوط البادرات والذى يتسبب عن الفطر السابق نفسه. وتحفظ القمح من الإصابة بالمرض الماحق. وعلى أية حال فإن الطفرات السالبة فى إنتاج Gac A، تنتج كثيراً من Pch و Pvd. للحصول على تفسير اكبر للوقاية من المرض الذى يتم بواسطة السلالة السالبة لـ Gac A، يجب دراسة الطفرات الثنائية السالبة فى إنتاج Gac A و Pvd مثل السلالة CHA - 496 التى أنشئت عن طريق الإحلال الجينى.

السلالة CHA- 496 تنتج كميات كبيرة من Pch و Sal بالمقارنة مع السلالة CHAO، وتحفظ القمح من الإصابة بالفطر *P.ultimum* و *Gaeumannomyces graminis* مسبب المرض الماحق (جدول رقم ٤٠)، بينما نبات ال Cress والخيار لم يمكن حفظهما. إن إضافة كلوريد الحديديك يكبح إنتاج Pch و Sal بواسطة السلالة CHA- 496 فى المعمل، ويفسد وقاية النبات فى 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 / او Sal تكون داخلة فى مقدرة الطفرة المزدوجة السلبية فى إنتاج Pvd وGac A من السلالة CHAO لكبح أمراض جذور العائلة النجيلية.

جدول رقم (٤٠) : تأثير الحديد على تثبيط مرض سقوط البادرات المتسبب عن الفطر *P.ultimum* والمرض الماحق فى القمح المتسبب عن الفطر *G.g.tritici* بواسطة استعمال البكتيريا *P.fluorescens* سلالة CHAO، وطفرة CHA - 496 السالبة الإنتاج لكل من Gac A و Pvd.

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

ملاحظات على الجدول:

السلالة CHAO هى الاصلية اما CHA - 496 فهى طفرة من السلالة الاصلية لا يوجد فيها Gac A ولا Pvd. كان يضاف الحديد على شكل كلوريد الحديديك الى التركيز النهائى من ٩,٩ ميكروغرام حديد / g^{-1} من التربة الجافة. كان دليل المرض يقسم من صفر الى ٤، حيث إن صفر بدون مرض، أما ٤ تموت النباتات (Keet *et al* سنة ١٩٩٢).

إن إدخال Cosmid pME 3090 الى البكتيريا الوميضة سلالة CHAO التى هى عامل مقاومة حيوية جيد ضد امراض نباتية مختلفة، متسببة عن كائنات ممرضة كامنة فى التربة، يضاعف إنتاج المضادات الحيوية الناتجة عن التفاعلات الايضية بمقدار ٣ – ٥

أضعاف، هذه المضادات هى Plt و Phl فى المعمل . السلالة CHAO/ pME 3090، أيضا تنتج كمية كبيرة من ال Plt و Phl فى منطقة الرايزوسفير فى القمح المصاب أو غير المصاب بالفطر *P.ultimun* . إن كفاءة المقاومة الحيوية للسلالة الاصلية والسلالة المركبة قد تم مقارنتهما باستعمال اتحادات من العائل – الكائن الممرض المختلفة فى نظام الجينوتايب. لا تتأثر وقاية القمح بالإنتاج 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 الاصلية *CHAO*. السلالات المنتجة كميات كبيرة من المضادات الحيوية، تحفظ جذور نبات الدخان بشكل معنوى أفضل ضد الفطر *Thielaviopsis basicola* من السلالة الاصلية، ولكن تخفض بشكل كبير نمو نباتات الدخان، وتكون سامة أيضا على نمو نباتات الذرة السكرية. عندما تنمو السلالة المركبة على بيئة King's Bagar او مولت آجار، فإنها تثبط جميع الكائنات الممرضة بشكل أفضل مما تعمله السلالة الاصلية *CHAO* . إن مادتى Plt و Phl المصنعتين كانتا سامتين لجميع الفطريات المختبرة. 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. وبالتالى يمكن القول بأن الانواع النباتية أفضل من الكائن الممرض فى تحديد فيما إذا كانت Cosmid pME 3090فى *P.fluorescens* السلالة CHAO تؤدى الى تحسين المقاومة الحيوية وتثبيط المرض (جدول رقم ٤١).

جدول رقم (٤١) : درجة تثبيط الفطريات الممرضة النباتية بواسطة السلالتين البكتيريتين الأصلية والمركبة على أطباق الآجار.

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

ملاحظات على الجدول : يقاس تثبيط نمو الفطر (ملم) بين حافة ميسليوم الفطر والمستعمرة البكتيرية .

(-) الفطر ينمو ضعيف جداً.

دور السلسيلك أسد في المقاومة المستحثة

بعض أنواع البكتيريا غير الممرضة، التى تعيش فى منطقة الرايزوسفير، تحدث تغيرات فسيولوجية خلال النبات كله، جاعلة إياه أكثر مقاومة للكائنات الممرضة. هذه الظاهرة تسمى المقاومة الجهازية المستحثة Induced systemic resistance (ISR). لقد ذكرت هذه الظاهرة فى كثير من بكتيريا الرايزوسفير فى كثير من النباتات. تخفض المقاومة المستحثة أعراض المرض لمدى واسع من الكائنات الممرضة، وإن صفاتها الفسيولوجية فى دراسة مستمرة ومتقدمة. فى بعض الحالات فإن ISR بواسطة بكتيريا الرايزوسفير تتميز بواسطة التجمعات الجهازية للبروتينات المتعلقة بالمرضية، تلك التى تكون أيضاً مترافقة مع الكائن الممرض الحاث على المقاومة الجهازية المكتسبة، ويطلق عليها Systemic acquired resis-

tance (SAR). فى حالات أخرى فإن *ISR* لبكتيريا الرايزوسفير لا تكون مترافقة مع تجمع البروتينات المتعلقة مع المرضية.

كيف يقود تفاعل الجذر مع بكتيريا الرايزوسفير الى *ISR*؟؟ لاتزال الاجـابة عن هذا السؤال غير واضحة (١٩٩٧)، ولكن هناك نوعين من العوامل البكتيرية المحددة، ضرورية لـ *ISR* قد تم وصفهما تماماً. سلسلة O-antigenic من الغشاء الخارجى لمادة Lipopolysac-charides (LPS) من البكتيريا *P.fluorescens* سلالة *WCS- 417r* و *WCS - 374*، يبدو أنها المسئولة عن *ISR* لذبول الفيوزاريوم فى الفجل. بالإضافة لذلك فإن LPS من *WCS-417-r* قد وجدت أساسية لـ *ISR* لذبول الفيوزاريوم فى القرنفل. وعلى أية حال فإن الطفرات من *WCS - 417r* و *WCS- 374* الخالية من *LPS* كانت لاتزال قادرة على خلق مقاومة للذبول الفيوزاريومى فى نباتات الفجل النامية فى محلول مغذى يحوى مقداراً منخفضاً من الحديد. فى حالة المستوى المنخفض من الحديد، فإن البكتيريا تنتج جزيئات من الحديد المخلبى يسمى Siderophores ليكتسب الحديد الكافى. السايدروفورز تفرز فى البيئة، وأن المعقد من الحديد الذى يكون فيها إختيارياً فى الاسترداد مع المستقبلات البروتينية الخاصة بالأغشية. المعلومات عن الدور الذى تقوم به السايدروفورز فى *ISR* محدودة ومثيرة للخلاف. هناك طفرة واحدة من البكتيريا *P.fluorescens* وهى سلالة *CHAO* غير قادرة على إنتاج سايدرفور Pyoverdin وتفتقد المقدرة على الحث على *ISR* ضد فيروس نكروزز الدخان فى الدخان. فى نظام ذبول فيوزاريوم – الفجل ذو الحديد المنخفض، فإن الطفرة التى تفتقر إلى Pyoverdin من *WCS- 374* و *WCS- 417r* تحث على مستويات المقاومة نفسها فى السلالة الاصلية. وعلى أية حال فإنه فى هذا النظام فإن الدور لل Pyoverdin لا يمكن استبعاده، وذلك لأن استعمال ال Pyoverdin المنقى (على الجذر) من المزارع المعملية للسلالة *WCS- 374* تحث على *ISR*. أما السلسلك أسد *(SA)* فهو نوع آخر من السايدروفورز المنتج بواسطة السلالتين *WCS- 417r* و *WCS- 374* و *CHAO* التى يمكن أن تدخل فى ال *ISR*. إن *SA* عامل مهم فى ال *SAR* المستحثة من الكائن الممرض، ويمكن أن تحث على مقاومة جهازية للكائنات الممرضة بعد معاملة الجذر او التربة. ولغاية الآن (١٩٩٧) فإن الدليل على تدخل *SA* البكتيرى فى *ISR* لايزال عرضياً لانه لا توجد طفرات تفتقر الى *SA* من الرايزوبكتيريا الحاثة على *ISR* قد اختبرت على إنتاج *ISR*.

إن البكتيريا *P.aeruginosa 7NSK2* هى رايزوبكتيريا حاثة على نمو النبات، وعامل مقاومة حيوية فعال ضد الكائنات الفطرية الممرضة للجذور مثل *Pythium splendens* فى الطماطم. فى الظروف المحددة للحديد، تنتج هذه السلالة ثلاثة أنواع من السايدروفورز هى Pyoverdin، Pyochelin و SA. هذا الأخير هو أيضاً باديء للبناء الحيوى لمادة *Pyoche-lin*. فى الدراسات على الطفرات التى تفتقر الى السايدروفورز على نباتات الطماطم، فان ال Pyoverdin او ال Pyochelin، ثبت بأنهما ضروريان فى السلالة الاصلية للحصول على مستوى عال من المقاومة الحيوية لسقوط البادرات الناتج عن الفطر بثيم. إن ال Pyoverdin و Pyochelin اكثر احتمالاً لأن يعملا عن طريق التنافس على الحديد مع الفطر بثيم، وعلى أية حال بالنسبة لمادة Pyochelin فقد ذكر Buysens *et al.* سنة ١٩٩٦ أن هناك احتمالية تغير طريقة العمل فى المقاومة المستحثة. فى الدراسة نفسها وجد أن الطفرة التى تنتج *SA* على أساس أنه السايدروفور الوحيد، فإنها تستعيد بعض المقدرة على تثبيط مرض سقوط البادرات الناتج عن بثيم. قد يكون السبب راجعاً فى ذلك إلى المقاومة المستحثة بواسطة *SA*.

فى دراسة على نباتات الفاصوليا كانت هناك اختبارات لتحديد الرايزوبكتيريم *P.aeruginosa 7NSK2* فيما اذا كانت مهمة فى احداث مقاومة مستحثة ضد الفطر *Botry-tis cinerea*. وعن طريق الاختلافات فى حالة التغذية بالحديد للبكتيريا أثناء التلقيح، فلقد وجد أن المقاومة المستحثة بواسطة السلالة *P.aeruginosa 7NSK2* هى عبارة عن تنظيم فى الحديد. ونظراً لأن هذه السلالة تنتج ثلاثة سايدروفورز، تحت ظروف تواجد الحديد المحدودة وهى Pyoverdin ، Pyochelin و SA، فلقد اختبرت هذه المواد الثلاثة لمعرفة دورها فى المقاومة المستحثة عن طريق استعمال طفرة تفتقر الى واحد أو أكثر من هذه المواد. تبين من نتائج التجارب أن سلسيلك أسد يعتبر أساسيا للحث على المقاومة ضد الفطر *B.cinerea* بواسطة سلالة البكتيريا *7NSK2* فى الفاصوليا ولا يمكن استبعاد دور ال Pyo-chelin. كذلك فإن حالة التغذية بالحديد فى فترة تحضير اللقاح تؤثر على حالة نسخ نشاط جين بناء حمض السلسيلك وال Pyochelin بالطريقة نفسها، كما يتأثر فى الحث على المقاومة الجهازية للفطر *B.cinerea*.

II : الجنـــس Bacillus

مقـــدمة :

أفراد هذا الجنس بكتيريات عصوية هوائية او غير هوائية اختيارياً. تكون جراثيم داخلية، تتحرك عن طريق أسواط جسمية، بعض الأنواع غير متحرك، الجراثيم الداخلية بيضية 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 المثالى لهذا الجنس *Bacillus subtilis*.

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

من أكثر السلالات معرفة وذات أهمية كبيرة فى المقاومة الحيوية هى *B.subtilis A13*. عزل هذا الكائن منذ ٢٥ سنة فى استراليا (هذا ما ذكره Broadbent سنة ١٩٧١)، هذه السلالة أختيرت على اساس مقدرتها التثبيطية فى المعمل لعديد من الكائنات الممرضة، وتبين أيضا أنها تشجع نمو كثير من النباتات مثل الحبوب، الذرة الرفيعة، الجزر وغيرها، عند استعمالها حقنا فى البذور.

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

التربة المحتوية مسبب المرض. ولكن هل تستطيع هذه البكتريا مقاومة المرض الماحق فى الحقول الملوثة طبيعيا بالكائن الممرض عند إدخالها فى التربة على شكل معاملة بذور؟؟ هذا غير واضح تماما لغاية سنة ١٩٩٧، ولكن كثيراً من نتائج التجارب تبشر بالنجاح التام.

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

من تلك الأمثلة ما يلى:

١ – *B.cereus UW85* لمقاومة مرض سقوط البادرات فى البرسيم الحجازى وأمراض أخرى كثيرة.

٢ – *B.megaterium B153- 2-2* لمقاومة مرض العفن الرايزوكتونى فى جذور فول الصويا.

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

٤ – *B.mycoides* لمقاومة المرض الماحق فى القمح.

ذكرت بعض التجارب التى أجريت فى الصين، نجاح استعمال أنواع من البكتيريا *Bacillus* كعوامل تسبب زيادة الإنتاج، 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*، فى منطقة الرايزوسفير والرايزوبلين تختلف عن تلك الموجودة فى Bulk soil، ومن الممكن عزل سلالات من أنواع *Bacillus* والتى يمكن أن تكون ذات كفاءة رايزوسفيرية فى القمح، أو ذات نشاط فعال ضد مدى واسع من الكائنات الممرضة النباتية فى جذور القمح.

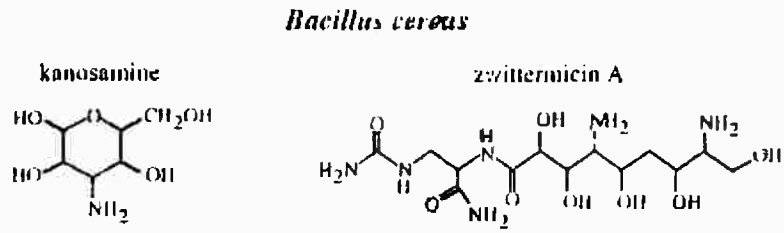
السلالة *B. cereus UW-85*

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

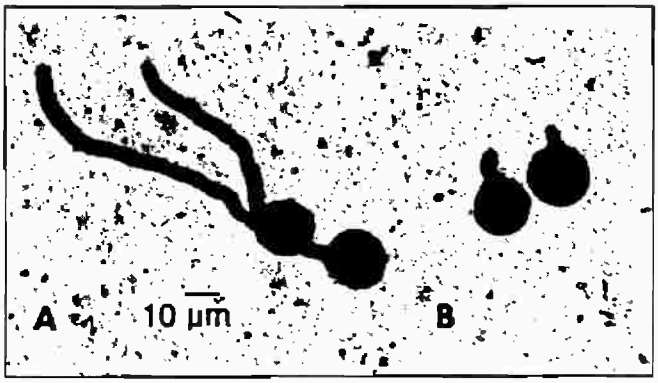
الفطر *Pythium aphanidermatum*، والفول السودانى من الإصابة بالفطر *Sclerotinia minor*، وهى أيضاً تزيد وتشجع نمو بكتيريا العقد الجذرية على فول الصويا، وتسبب تغيرات حقيقية فى العلاقات البكتيرية على جذور فول الصويا.

إن تثبيط مرض سقوط بادرات البرسيم الحجازى فى المعمل، يكون مترافقاً مع ظهور أجزاء من المضادات الحيوية خارجة من الخليج فى المزارع البكتيرية كاملة التجرثم فى السلالة المذكورة. وقد تبين أن هناك نوعين من المضادات الحيوية تفرزهما هذه السلالة فى المزرعة (شكل ٢٤)

إن المستعمرات والراشحات البكتيرية، المأخوذة من المزارع البكتيرية للبكتيريا *B.cereus UB-85*، تثبط سقوط البادرات المذكورة سابقا، وذلك لأنها تفرز نوعين من المضادات الحيوية، الأول يسمى Zwittermicin A (شكل ٢٤) وهو Aminopoly of مكون من ٣٩٦ Da والذى هو كايتونك على pH7. اما 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 ٢٥). أما المضاد الثانى فهو يسبب انتفاخاً فى أنبوبة الإنبات وبالتالى يفقدها المقدرة على إحداث المرض (جدول رقم ٤٢).



شكل (٢٤) : التركيب الكيماوى للمضادات الحيوية، التى تفرزها البكتيريا *B.cereus* سلالة UB-85.



شكل (٢٥) : تأثير المضاد الحيوى Zwittermicin A **على إنبات حويصلات الفطر** Phytoph-thora medicaginis **بعد ساعتين من نقله الى البيئة الغذائية المناسبة. A = غير معاملة. B = معاملة بكمية ١٠٠ ميكو غرام / مل من المضاد الحيوى.**

أما بالنسبة السلالات الناتجة من الطفرات باستعمال Tn 917 او مادة Mitomycin C، وجد أنه من بين ٢٦٨٢ طفرة، هناك خمس طفرات فقط تخفض تجمع المضادات الحيوية وذات نشاط عال فى تخفيض المرض، ومن بين ١٧٠٠ طفرة هناك ثلاث طفرات ذات كفاءة منخفضة فى تخفيض المرض، وتجمع المضادات الحيوية بكمية أقل من السلالة الأصلية. إن كمية المضادات الحيوية التى تتجمع بواسطة الطفرات، تكون مرتبطة معنوياً مع مستوى تخفيض المرض. إن إضافة المضادات- سواء الأول أو الثانى- الى نباتات البرسيم الحجازى المحقونة بمزرعة طفرة غير مثبطة للمرض يؤدى الى تثبيط المرض. هذه النتائج تؤدى الى القول بأن البكتيريا *B.cereus UW- 85* تفرز نوعين من المضادات الحيوية ذات التأثير المطهر للفطريات Fungistatic، والتى تشارك فى تثبيط مرض سقوط بادرات البرسيم الحجازى.

أما بالنسبة للطفرة *UW030* ففى جدول (رقم ٤٣)، يتبين تأثير هذه الطفرة، حيث إنه دون إضافة المضاد الحيوى يكون تأثيرها على تخفيض المرض قليلاً جداً، مما يدل على أنها لا تفرز أياً من المضادات الحيوية المذكورة سابقاً.

جدول رقم (٤٢): تثبيط استطالة أنبوبة الإنبات للجراثيم الهدبية للفطر *P.medicaginis* بالمضادات الحيوية المفرزة من قبل البكتيريا المضادة.

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

ملاحظات على الجدول :

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

جدول رقم (٤٣) : تأثير المضادات الحيوية على تثبيط المرض بواسطة الطفرة UW030 فى سقوط البادرات.

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 تحوى ٣ بذور، والنتيجة مأخوذة من ٥٤ بادرة. الكنترول كلها سليمة.

Pm تعنى ٣ x $١٠^{٣}$ جرثومة هدبية من الفطر الممرض أضيفت إلى كل أنبوبة اختبار.

TSB = Trypticase Soy broth، *ZmA* = المضاد الحيوى الأول.

العزلتان *A13* و *AF-1*

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

أما العزلة *AF-1*، كان أول عزل لها من الخلايا المتحللة للفطر *Sclerotium rolfsii*، 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 بانها تعمل على شكل رايزوبكتيريم 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* يسبب زيادة مستويات الفينولات الكلية وأنزيمات Lipoxygenase و Peroxidase، Phenylalanine ammonia lyase فى البادرات المبكترة، 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، وتتكاثر الخلايا البكتيرية فى مكانها وتستعمر سطح الميسيليوم. إن نمو السلالة *AF-1* يؤدى الى تحطيم جدار الخلية، ويتبع ذلك تحلل الخلية. أما حقن السلالة *AF-1* فى بيئة محتوية *A.niger* بعد مدة، صفر، ٦ و ١٢ ساعة فإنها تثبط أكبر من ٩٠٪ من النمو الفطرى. اما 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 أولى للكربون يدعم نمو

البكتيريا *B.subtilis* مثل الزيادة التى تسببها إضافة مادة الشيتين. البروتين المستخلص والمرسب من راشح مزرعة *B.subtilis* سلالة *AF-1* له تأثير معنوى فى وقت نمو الفطر *A.niger*. أما بذور الفول السودانى المبكترة بالبكتيريا *AF-1*، فإنها تظهر إنخفاضاً كبيراً فى حدوث مرض عفن التاج المتسبب عن الفطر *A.niger* عند زراعتها فى التربة الملوثة بالفطر، هذا يؤدى الى القول باحتمال الدور الذى تقوم به هذه البكتيريا فى المقاومة الحيوية للفطر *A.niger*.

مما سبق ذكره، يتأكد لدينا أن العزلة *AF-1* عامل مقاومة حيوية ومشجع لنمو النبات *PGPR*، وهذا ما أيده Podil *et al* سنة ١٩٩٥، وهى تثبط نمو الكائنات الفطرية الممرضة للنبات عن طريق إفراز مواد منتشرة ذات تأثير مطهر فطرى شبيهة بالمضادات الحيوية. كذلك فإن السلالة *AF-1* عندها المقدرة على خلق مقاومة مستحثة فى العائل فى بعض أنواع البسلة والفول السودانى، بالإضافة الى تشجيع العقد الجذرية فى البسلة الهندية. تكون كفاءة المقاومة الحيوية فى هذه البكتيريا عن طريق المواد الشبيهة بالمضادات الحيوية، أو عن طريق المقاومة المستحثة فى النبات. كذلك هناك طريقة أخرى تعتمد عليها هذه البكتريا فى المقاومة الحيوية وهى تحليل جدر خلايا الفطر الممرض، كما يحدث فى مقاومة الفطر المسبب للمرض الماحق فى القمح. إن مقدرة البكتيريا *AF-1* على استعمار الميسيليوم الفطرى وبالتالى تحطيم الجدار الخلوى، يفسر على أن البكتيريا ترتبط مع السطح الفطرى وتتكاثر فى الموقع نفسه. تكون حساسية الفطر للبكتيريا عالية كلما صغر عمر المزرعة الفطرية، وذلك لان تثبيط نمو الجدار الخلوى يكون نشيطاً فى الأطوار الاولى من النمو (جدول ٤٤). إن نمو البكتيريا *AF-1* على التحضيرات الميسيلومية للفطر *A.niger* يؤدى الى القول بأن هذه السلالة عندها القابلية لإنتاج Extracellular proteins *(EP)* والتى تتدخل فى النمو الفطرى. إن تحضيرات *EP* من مزارع *AF-1* النامية على الشيتين توقف نمو الفطر *A.niger*، وهذا يؤدى إلى القول باحتمال تدخل مادة Chitin inducible proteins فى عملية توقف نمو الفطر المذكور.

لقد ذكر فى مراجع كثيرة أن الكائنات الحية الدقيقة القادرة على تحليل الكائنات الاخرى، تلعب دوراً مهماً فى 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 (٤٤) : تأثير البكتيريا *AF- 1* على نمو الفطر *A.niger* فى المزارع المزدوجة السائلة.

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

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* في 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 خلال فترة النمو فى المعمل. إن كلا من التشوهات الفسيولوجية والظروف البيئية تزيد فى قابلية النباتات للإصابة بالكائنات الممرضة الفطرية بعد نقلها الى بيئة ال Compost (مزارع من المواد العضوية المتحللة). بمعزل عن العفن الرمادى المتسبب عن الفطر *B.cinerea* والذى هو مستوطن الصوبات الزجاجية، فإن دخول الكائنات الممرضة *Pythlum*، *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 النسج. كذلك فإن هذين الفطرين يسببان مشاكل كبيرة فى مراقد البذور. إن استعمال المبيدات الفطرية Prophylactic ثلاث

مرات فى الأسبوع هى الطريقة المقنعة 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 المنسبب عن كل من *Pythium* و *Phytophthora* فى كثير من النباتات مثل *Astilbe*، *Photinia*، *Hemer-ocallis* وبادرات الجنس *Brassica* تحت ظروف الرطوبة العالية جدا، 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 ٣ x ١٠^٥ وحدة تكوين مستعمرات/ غرام طازج من الجذور Root Fresh weight (RFW) ويكون اللقاح الفطرى للكائن الممرض أقل من أو يساوى ١٠^٣ جرثومة بيضية / غرام بيت. تستعمر البكتيريا *Cot-1* النظام الجذرى المتكشف 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 ٤ x ١٠^٦ و ٣ x ١٠^٥ وحدة تكوين مستعمرات/ غرام *RFW*، فإن أعداد الجراثيم تبقى بين ١٠^٥ و ١٠^٦ وحدة تكوين مستعمرات/ غرام *RFW* فى المقاطع الأكبر عمراً من النظام الجذرى وبين ١٠^٤ و ١٠^٥ 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 الى القول بأن النشاط الضعيف للمقاومة الحيوية يكون بسبب انطلاق مركبات مثبطة بواسطة جذور *Daphne* (جدول رقم ٤٥، ٤٦).

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 بنسبة كبيرة ويساهم فى وقاية النباتات بصفة تجارية.

جدول رقم (٤٥) : تأثير استعمال البكتيريا B.subtilis Cot-1 على مرض سقوط البادرات فى بعض النباتات.

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

ملاحظات على الجدول: المبيد الفطرى المستعمل Metalaxyl.
الجراثيم البيضية المستعملة 10^{2} جرثومة/ غم بيت. المخلوط يستعمل فيه 5×10^{2} جرثومة بيضية/ غرام بيت.

جدول رقم (٤٦) : تأثير تركيز لقاح البكتيريا B.subtilis Cot-1 والفطر Pythium ultimum على النسبة المئوية لسقوط البادرات فى نبات Photinia.

المعاملة	الجرعة	لقاح الفطر *Pythium* (جرثومة بيضية/ غرام بيت)			
		10^{1}	10^{2}	10^{3}	10^{4}
مبيد مينا ليكسايل	--	٦	٢	٦	٣
Cot - 1	10^{9}	٦	٧	١٤	٦١
Cot - 1	10^{8}	٢	٦	٥٤	٦٩
Cot - 1	10^{7}	٣٠	٧٤	٩٧	٩٥
Cot - 1	10^{5}	٩٥	٩٤	٩٦	٩٨
كنترول	--	٩٤	٩٩	٩٦	٩٨

III : الجنـــس Streptomyces

مقـــدمة :

تتميز أفراد هذا الجنس، بأن لها هيفات متفرعة رفيعة، دون جدر عرضية، يتراوح قطرها حوالى ٠,٥ ٢ ميكرون. عند اكتمال النمو، يكون الميسيليوم الهوائى سلاسل جراثيم من ثلاثة الى 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 حبيبى أو مسحوقى أو مخملى. تكون الأنواع المتعددة والسلالات المتعددة من هذا الجنس صبغات مختلفة كثيرا، والتى 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 المتدرنة. 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 للتحسين الوراثى لأنواع الجنس *Sreptomyces* 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: السليوليز، هيميسليوليز، شيتينيز، أمليز، جلوكاينز وغيرها.

الدراسات المستفيضة التى أجريت على راشح 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 Reddi & Rao أن عزلات من *Streptomyces ambofaciens* كانت قادرة على مقاومة مرض سقوط بادرات الطماطم المتسبب عن الفطر بثيم، 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 ال *Streptomyces* على شكل جراثيم أو ميسيليوم أو اتحادات من كليهما فى مراقد الإنبات فى الصوبات الزجاجية. ومن الجدير بالذكر أن Rothrock & Gottlieb سنة ١٩٨١، ذكرا 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 الفطر المذكور فى التربة. هناك كثير من الدراسات قد أثبتت الأهمية الكمية والنوعية لانواع الجنس *Streptomyces* فى منطقة الرايزوسفير؛ حيث إنها من الممكن أن تعمل كمشجعات نمو نباتية، بالإضافة الى استعمار الجذر حتى لو كانت بتركيز $١٠^{٢}$ – $١٠^{٥}$ 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 الأطباق. 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 في المقاومة الحيوية:

١ – يمكن أن يقوم الجنس *Srteptomyces* بتثبيط نمو الجراثيم، كما فى حالة الفطر *Helmin-thosporium 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. gelda-*

nus فإنه ينتج المضاد الحيوى Geldanamycin ذا 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 هى:

1- Hemipyocianine

2 - Chlororaphin

3 - Phenazine - A

4 - Carboxylic acid

5 - Phenazine - B

الفطريات التي تقاوم حيويا باستعمال أنواع الجنس *Streptomyces*

١ – *Fusarium oxysporum f.sp. cubens* على الموز معاملة فسائل. ويقاوم مرض فيوزاريوم على الدخان (جدول ٤٧).

٢ – *Pythium sp.* مسبب عفن جذور نباتات قصب السكر والذرة، معاملة عقل وبذور.

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 او الجذور او 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 الشمام 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 فى الصليبيات المتسبب عن *Alternaria brassicola* والفطر *R.solani*. ومن ناحية أخرى وجد أن رش البيت *Peat* بمعلق من أنوع *Streptomyces* يخفض مرض عفن الجذر فى الخيار المتسبب عن الفطر *Pythium* وفى حالات كثيرة يمنع ذبول الفيوزاريوم فى القرنفل.

١١ – لقد وجد Tahvonen سنة ١٩٨٨ أن استعمال تحضيرات من المسحوق الجاف من أنواع *Streptomyces* بتركيز ٥ – ١٥ غرام/ kg^{-1} فى تعفير البذور و ٠,١ – غرام/ ١٠م٢، فعالة فى مقاومة أمراض جذور الخيار وذبول القرنفل. كذلك وجد أن تعفير حبوب القمح والشعير بالتحضيرات المسحوقية من *S.griseoviridis* يكون ناجحاً ضد الأمراض، التى تصيب الجذور والمتسببة عن أنواع فيوزاريوم و *Bipolaris sorokiniana* فى تجارب الصوبا الزجاجية، ووجد أيضاً أن ٣ – ١٥ غراماً من التحضيرات المسحوقية/كغم بذور تكون فعالة فى خفض عفن الجذر، يبقى التأثير الفعال على البذور المعاملة ثابتا لمدة ٢ – ٤ أسابيع عندما تخزن البذور المعاملة فى ظروف جافة. يبين (جدول ٤٨) قائمة بالفطريات التى تقاومها أنواع مختلفة من الجنس *Streptomyces*.

تأثير الجنس *streptomyces* على النبات العائل:

إن طرق مقاومة امراض النبات المختلفة، بما فيها استعمال عوامل المقاومة الحيوية، تسبب زيادة فى نمو النبات، هذه الزيادة، تعزى الى التأثير المباشر المرافق لمقاومة الكائنات الممرضة النباتية.

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

لقد وجد أن بعض نباتات الذرة التى تنمو مترافقة مع الفطر *Pythium graminicola* فى تربة معاملة بمضادات حيوية غير نقية من الجنس *Steptomyces*.، كانت أطول وذات جذور أعمق فى التربة، من تلك النامية فى تربة غير معاملة والتى تحتوى *P.graminicole* فقط. كذلك وجد أن معاملة نباتات الموز بانواع من الاكتينومايستس مضادة أو ضعيفة التضاد فى التربة نفسها التى تنمو فيها النباتات، تؤدى إلى زيادة كبيرة فى النمو أكثر من تلك المعاملة بالاكتينومايسيتس شديدة التضاد المأخوذة من تربة أخرى. كذلك وجد أن بعض الكائنات المضادة أو راشح مستعمراتها يكون له تأثير سام على النبات، ويثبط إنبات البذور أو نمو البادرات أو نمو النبات الكامل، فى بعض أنواع النباتات.

لقد ذكر Turhan سنة ١٩٨١ أن السلالة *C - 2- 9* من الجنس *Streptomyces* لم يكن لها تأثير ضار على انبات البذور او نمو البادرات او النباتات المعاملة بها، بل بالعكس فهى تحسن مظهر النبات ويكون إنتاج الثمار أفضل منه فى 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 وهى تحضير مسحوقى تجارى من الجنس *Streptomyc-es*، لا تزيد فى إنتاج الشعير فقط، بل تزيد فى انتاج القمح زيادة معنوية، وهى تزيد بشكل عام إنتاج النجيليات، الخيار والقرنفل فى التجارب الخولية بنسب تتراوح من ١٠ – ٣٠ ٪. أما فى نباتات الخس زاد الإنتاج ٣٠ ٪ وانخفضت الإصابة بالفطر الممرض *Botrytis cinerea* بنسبة ٧٠ ٪. وانخفضت الإصابة بالفطر *R.solani* بنسبة ٦٠ ٪. يمكن القول بشكل عام أن التحضيرات المختلفة من الجنس *Streptomyces* المستعملة فى المقاومة الحيوية، عدا عن أنها تقاوم كثيراً من الأمراض الاقتصادية المهمة، فهى تسبب زيادة او تحسناً فى نمو وإنتاج معظم النباتات التى تعامل بها، بغض النظر عن النوع البكتيرى المستعمل فى المقاومة او الفطر الممرض.

جدول رقم (٤٧) : التأثير التثبيطى لأنواع من Streptomyces النامية على بيئات مختلفة ضد الفطر Fusarium tabacium .

نوع الكائن المضاد	ملم تثبيط فى البيئات الغذائية المختلفة							
	نترات + نشا		فول الصويا		جلايسيرول اسبرجين		مستخلص السمك	
	جافة	سائلة	جافة	سائلة	جافة	سائلة	جافة	سائلة
S.cyanoviridis	١٤	٣٨	١٣	٤٧	١٧	٣٥	١٧	٣٨
S.murinus	١٢	٣٢	١١	٥١	١٣	٢٨	١١	٢٥
S.griseoplanus	١٤	٣٧	١٢	٤٦	٢٤	٣٥	٢١	٤٦

جدول رقم (٤٨) : التأثير المثبط لأنواع من Streptomyces النامية على بيئة (نشا- نتريت) ضد فطريات ممرضة مختلفة.

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

كفاءة السلالة *WYEC - 108* في المقاومة الحيوية لاعفان البذور والجذور

تظهر السلالة *Streptomyces lydicus WYEC - 108* قوة تضاد فى المعمل، ضد الكائنات الممرضة النباتية الفطرية، فى اختبارات الأطباق، وذلك عن طريق إنتاج مضادات حيوية خارج الخلية ناتجة عن عمليات ال *Metabolites*. عند زراعة كل من *Pythium ultimum* أو *R.solani* فى بيئة سائلة مع هذه السلالة، يلاحظ تثبيط نمو الفطريات. أما عند استعمال جراثيم هذه السلالة او الميسيليوم المأخوذ منها، على شكل غلاف لبذور البسلة فإن هذا يؤدى الى حفظ البذور من الإصابة بالفطر *P.ultimum* عند زراعة البسلة فى 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. اما عند زراعة البذور المغلفة بوسائل المقاومة الحيوية فى التربة، قبل إدخال الكائن الممرض إليها بمدة ٢٤ ساعة أو بمدة ٩٦ ساعة بعد إدخال الكائن الممرض إليها، فإن أقل من ٢٥ ٪ من البذور النابتة تصبح مصابة (جدولا ٤٩، ٥٠)

الدراسات التى أجريت على مراقد الإنبات، أجريت أيضاً لاختبار التأثير على نمو النبات 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 الى تربة غير معقمة أو تربة معقمة ومحقونة بالفطر الممرض *P.ultimum* المزروعة ببذور البسلة أو القطن، أن هناك زيادة معنوية فى متوسط عدد النباتات السليمة، وفى طول النبات ووزن النبات فى كلتا الحالتين، بالمقارنة مع نباتات الكنترول غير المعاملة والمزروعة فى اراضٍ مماثلة (جدول ٥٢).

أثبتت الدراسات الحقلية أن هيفات أفراد السلالة *WYEC - 108* عندها القدرة على الاستعمار والانتقال الى 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^{5} وحدة تكوين مستعمرات/ غرام فى منطقة الرايزوسفير، بينما

تنخفض التجمعات فى غير منطقة الرايزوسفير لهذه السلالة على الأقل بنسبة ١٠٠ ضعف (من ١٠^٥ الى ١٠^٣) أو أقل وحدة تكوين مستعمرات/ غرام. جدول ٥١.

إن ثبات 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 يوما او أكثر. عند وضع بذور كل من البسلة، القطن، والذرة السكرية فى اراضٍ غير معقمة أو معقمة محتوية ١٠^٦ 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 ١٠^٥ وحدة تكوين مستعمرات/غرام وزن رطب من الجذور، وجدت أنها لاتزال على جذور البسلة فى التربة المعقمة المعاملة، وفى الظروف المعاكسة ١٠^٤ 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، فى الآجار، والذى بعدئذ استعمل على شكل غشاء لتغليف شريحة overslips. بعد ستة ساعات من تحضين هذه المستحضرات فى أوعية الصبغ Staining jars على حرارة ٢٥° م، يحدث تفاعل مباشر بين الكائنات الحية الدقيقة، يمكن ملاحظته بالميكروسكوب الالكترونى. 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. هذه النتائج تظهر أن هذه السلالة ذات كفاءة عالية فى المقاومة الحيوية، يمكن استعمالها فى مقاومة أمراض عفن الجذور والبذور المتسببة عن جنس *Pythium*.

جدول رقم (٤٩) : تأثير معاملة بذور البسلة والقطن بالسلالة WYEC - 108 من البكتيريا ستريتومايسز على مرض عفن البذور، سقوط البادرات، الطول، الوزن الطازج، لنباتات البسلة والقطن المزروعة فى تربة محقونة صناعيا بالفطر P.ultimum سلالة P-8.

المعاملة	بسلة			قطن		
	٪ نباتات مريضة	سم طول النبات	غ وزن النبات الرطب	٪ نباتات مريضة	سم طول النبات	غ وزن النبات الرطب
تربة معقمة	--	--	--	--	--	--
كنترول (دون أى إضافات)	١٤,٣	١٨,١	٨٩	١٧,٥	١٨,٨	١٣٣
تركيز منخفض من الفطر الممرض	٨٥,٧	١,١٤	٠٩	٩٢,٩	٣,٥٧	١٩
تركيز مرتفع من الفطر الممرض	٩٦,٤	٠,٢٩	٠٣	٩٦,٤	٠,٣	١
تركيز منخفض من الفطر +سلالة البكتيريا	٢٨,٥	١١,٦	٩٨	٤٦,٤	١٣,٨	٧١
تركير مرتفع من الفطر + سلالة البكتيريا	٣٥,٧	١٣,٣	١٢٩	٣٥,٧	١٦,٤	٧٨
كنترول (سلالة البكتيريا)	٨,٢٦	١٩	١٥٠	٧,١٥	١٧,٣	٧٩
تربة غير معقمة	--	--	--	--	--	--
كنترول (دون أى إضافات)	٢١,٤	١٦	٧٣	٨,٢٥	١٩,٧	٩٦
تركيز منخفض من الفطر الممرض	٦٧,٨	٣,٥٨	٢٦	٨,٤٧	٣,٨٧	١٧
تركيز مرتفع من الفطر الممرض	٧٨,٦	٠,٧٤	١٢	٩٦,٤	١,٨٢	١٢
تركيز منخفض من الفطر + سلالة البكتيريا	٣٢,١	١٠,١	٦٥	٣٢,١	١٢,٨	٦٤
تريكير مرتفع من الفطر + سلالة البكتيريا	٤٦,٦	٧,٦٥	٤٤	٣٩,٢	٨,٣٧	٤١
كنترول (سلالة البكتيريا)	٨,٤٦	١٨,٩	٩٢	٢١,٤	١٦,٦	٦٢

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 (٥٠) : الاستعمال الاولى للسلالة WYEC-108 على جذور البسلة، القطن والذرة فى تربة معقمة وغير معقمة.

نوع التربة	متوسط العدد من وحدات تكوين مستعمرات/ غم وزن رطب من الجذر ± SD		
	البسلة	القطن	الذرة السكرية
معقمة	$^{٥}١٠ \times ٣,٠١ \mp ^{٥}١٠ \times ٢,٢٢$	$^{٥}١٠ \times ٢,٤٧ \mp ^{٤}١٠ \times ٢,٧٤$	$^{٣}١٠ \times ٦,٧٧ \mp ^{٣}١٠ \times ٣,٧٥$
غير معقمة	$^{٤}١٠ \times ٩,٧٨ \mp ^{٤}١٠ \times ٦,٢٩$	$^{٥}١٠ \times ٥,٢ \mp ^{٣}١٠ \times ٤$	$^{٣}١٠ \times ٣ \mp ^{٣}١٠ \times ١,٥$

ملاحظات على الجدول:

كان يؤخذ المتوسط من خمس عينات. عند الزراعة كانت تجمعات *WYEC - 108* $^{٧}١٠ \times ١$ فى التربة المعقمة و $^{٥}١٠ \times ١,٦$ وحدة تكوين مستعمرات / غرام تربة غير معقمة. كانت تؤخذ عينات الجذور بعد سبعة أيام من الإنبات.

جدول رقم (٥١) : التضاد الحيوى فى المعمل، الذى تظهره السلالة WYEC - 108.

الكائن الممرض	البيئة الغذائية	التضاد بعد		القدرةعلى الحياة بعد خمسة أيام
		٢ يوم	٥ يوم	
Pythium ultimum wheat 1	PDA	+++	+++	--
P. ultimum P8	PDA	+++	+++	--
P. ultimum P9	PDA	+++	+++	--
Aphanomyces euteiches Bob-F	CMA	+	+++	--
A. euteiches A6	CMA	++	+++	--
Fusarium oxysporum	PDA	-	++	+
F.solani f.sp. pisi	PDA	-	+	+
F. solani f.sp. pisi F6	PDA	-	++	+
Rhizoctonia solani	PDA	+	++	+
R. solani R4	V- 8A	+	++	+
Phymatotrichum omnivorum	PDA	+	++	+

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 كالسيوم توضع فى الة الطرد المركزى على ٣٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ١٥ دقيقة ثم يؤخذ العائم ليكمل إلى لتر من بيئة *V- 8A*.

جدول رقم (٥٢): مقدرة السلالة WYEC- 108 على تثبيط النمو الميسيليومى للفطر الممرض فى بيئة سائلة مع مصادر مختلفة من السكر كمصدر للكربون

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