الفصل الثامن

أهم أجناس الكائنات الحية الدقيقة المستعملة في المقاومة الحيوية

أولاً : الأجناس الفطرية

I : الجنس Trichoderma

مقدمـــة

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

إن ظاهرة التطفل على الفطريات ، وكذلك إنتاج المضادات الحيوية ، قد ذكرت أول مرة للجنس *Trichoderma* بواسطة Weindling سنة ١٩٣٢ و ١٩٣٤ . هناك تطبيقات تكنولوجية حديثة تستعمل فيها هذه الفطريات كعوامل مقاومة حيوية ، كلها اعتمدت على الأبحاث السابقة 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 Conidi-ogenous ، 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 إلى تسعة أنواع ، حددت على أساس الصفات المورفولوجية ، إلا أن العالم Bisset سنة ١٩٩١ أعادة دراسة الجنس *Trichoderma* وأضاف إليه بعض الـ Hypocrea ذات الأشكال المتقاربة ، وأدى ذلك إلى تقسيم هذا الجنس إلى خمس مجموعات ، وبالتالى فإن مفهوم الأنواع ضمن هذال الجنس واسع جداً ، وهذا أدى إلى تقسيم الأنواع إلى Specific وآخر Subspecific (هذا ما ذكره Samuels سنة ١٩٩٦) .

من أكثر أنواع الجنس *Trichoderma* تحديداً ومعرفة ، 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 فى المقاومة الحيوية :

١ - معاملة تربة

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 إلى التجمعات الطبيعية للفطر *Trichoderma* التى تنتشر بسرعة فى التربة المعقمة ، ولكنه لم يضع تفسيراً لذلك ، لأن هذه التجمعات تكون هي السبب فى مقاومة الكائن الممرض . ولقد ذكر أن الفطر *Trichoderma* ، أكثر مقاومة لمادة ميثايل بروماید 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 المرض *Sclerotium rolfsii* على نباتات الطماطم . يحتاج هذا النظام من المقاومة كميات كبيرة من المواد العضوية لينمو عليها الفطر المضاد (٤٢٠٠ كغم/هكتار) لمقاومة المرض . إلا أن العالم Kabana أستطاع 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 إلى مقاومة ناجحة للفطر *S. rolfsii* وأدى إلى زيادة انتاج 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 ، إلى التربة مع الفطر المضاد *T. harzianum* تشجع نمو الفطر المرض *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 ، وهذ يؤدى إلى خفض حدوث الأمراض لهذه الشتلات . كذلك تم الحصول على مقاومة ممتازة لذبول الفيوزاريوم

Obeikandl.com

فى الأقحوان سنة ١٩٨٤ ، وذلك بإضافة مزيج من المعلق 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 *(FB) Fermentor Biomass* والتى على شكل مسحوق وطين أو كرات من Alginate عند إضافتها إلى التربة ، فإنها تتكاثر بسرعة وتثبط المرض بكفاءة أكثر من استعمال الجراثيم الكونيدية العادية أو الجراثيم الكلاميدية . كذلك وجد أن الـ *(FB)* من فطريات *T. viride* و *T. 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 سابقاً ، 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 الأشعة الفوق بنفسجية من الفطر *T. harzianum* و *T. viride* . وكذلك حصل تحسن كبير فى نمو النباتات وزيادة انتاج 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 ، هى :

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 أو 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 الخضرى

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

من الأمثلة الأكثر نجاحاً فى المقاومة الحيوية باستعمال الجنس *Trichoderma* على الأجزاء 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 ، تماماً

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

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

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

٢ – ٣٣ ٪ لم تعط أية أعراض .

٣ – ١٧ ٪ لم تستجب لهذه المعاملة .

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

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

المنخفضة السائدة وقت الإزهار . وجد أن الفطر المضاد *T. pseudokoningii* غير قادر على النمو على حرارة أقل من 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 ٩ المضادات الحيوية التى يكونها الفطر *Trichoderma spp.*

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

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

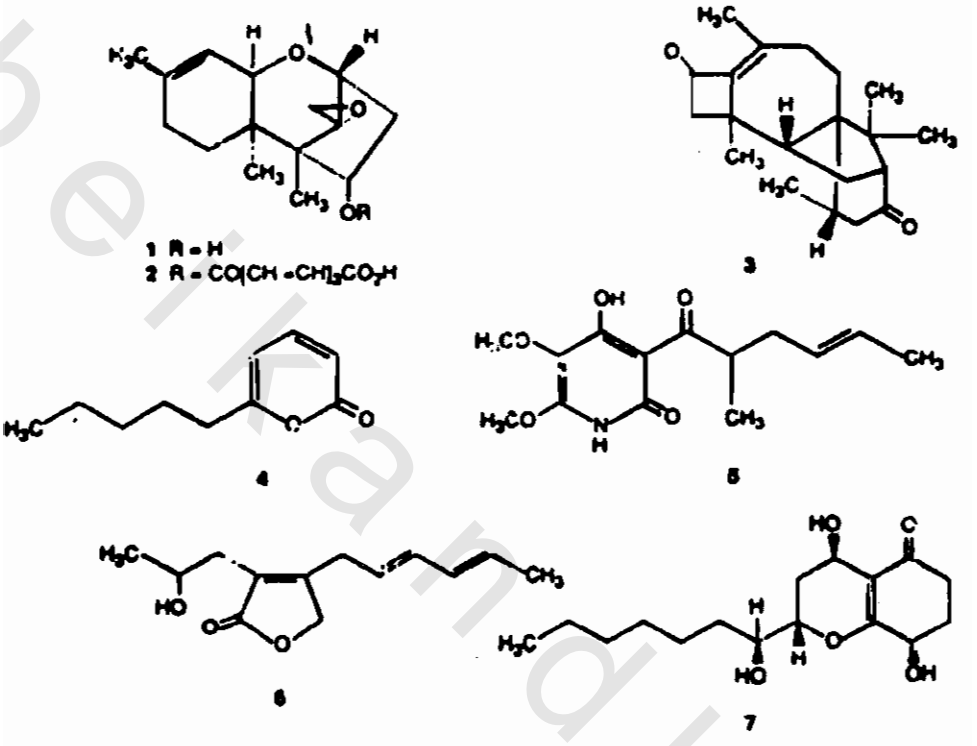
رقم ٣ : Harziandione ويفرزه الفطر *T. harzianum* . بعض سلالات معينة .

رقم ٤ : 6 - pentyl - 2 - pyrone ويفرزه الفطر *T. harzianum* السلالة المعروفة باسم (IMI 275950) . 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 .

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

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



شكل (٩) : 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

obeikandi.com

تريكوديرما عامل مقاومة حيوية ضد الفطريات الممرضة النباتية

Trichoderma As A Biocontrol Agent Aganist Pathogenic Fungi

مقدمة :

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

هذه الأجناس درست بشكل استثنائى ، إلا أن مجمل الدراسة (حوالى ٩٠٪) فى مجال المقاومة الحيوية لأمراض النبات الفطرية ، أجريت على سلالات الجنس *Trichoderma* . من هذه الأنواع :

1 - T. harzianum *2 - T. viride* *3 - T. virens*

4 - T. hamatum *5 - T. koningii* *6 - T. pseudokoningii*

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

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

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

١ – كفاءة هذه السلالات العالية فى التكاثر .

٢ – مقدرتها على البقاء وتحمل الظروف غير الملائمة .

٣ – فعاليتها فى مكافحة الفطريات الممرضة النباتية .

٤ – فعاليتها فى تشجيع نمو النبات .

هذه الصفات ، جعلت الفطر تريكوديرما جنس موجود دائماً وبكثرة فى أى مكان ، وبكثافة عالية بنسبة ٣ ٪ من مجموع العزلات الفطرية فى الغابات ، وحوالى ١,٥ ٪ من العزلات المأخوذة من التربة العادية . زيادة على ذلك ، فإن لقاح التريكوديرما يتكشف وينمو أفضل فى الرايزوسفير حول النباتات المريضة منه حول النباتات السليمة ، وذلك لأن النباتات المريضة تفرز مواد تستعمل من قبل الفطر تريكوديرما كمغذيات مناسبة لنموه .

سلالات التريكوديرما كعوامل مقاومة حيوية :

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

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

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

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

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

STRAIN	FUNGICIDE
T. viride T1	Benomyl
T. harzianum	Benomyl
T. harzianum WT-6	Benomyl
T. viride	Benomyl
T. virens	Benomyl
T. harzianum	Benomyl
T. viride	Benomyl
G. virens	Benomyl
Trichoderma spp.	Methyl bromide
Trichoderma spp.	PCNB
T. viride	Captafol
T. harzianum	
Trichoderma spp.	Captan
	Chlorothaloni l Iprodione
	Procymidone
	Vinclozolin
T. harzianum	Diclofluanide

الميكانزم الداخل فى المقاومة الحيوية من قبل أنواع التريكوديرما :

١ - تشجيع العوامل الدفاعية فى النبات

Stimulation of The Plant Defensive Mechanisms

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

٢ - المنافسة Competition

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

١ – عندما يكون لديه قدرة على التغلب على التأثيرات الفطرية السامة فى التربة ، الناتجة من نواتج التمثيل الغذائى من أنواع الفطريات الأخرى .

٢ – عندما يكيف نفسه تحت ظروف شديدة المنافسة .

تنمو سلالات التريكوديرما بسرعة عندما تحقن فى التربة وذلك لسببين :

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

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

٣ - التضاد الحيوى Antibiosis

يدل مفهوم هذا الاصطلاح ، على التفاعلات التى تشمل مركبات قابلة للانتشار ذات وزن جزيئى منخفض، أو المضادات الحيوية المنتجة بواسطة الكائن الحى الدقيق، والتى تثبط نمو كائن حى دقيق آخر . بالنسبة للجنس تريكوديرما ، فإن لديه سلالات مختلفة تنتج مركبات متطايرة وغير متطايرة والتى تثبط نمو الفطريات الممرضة . بعض سلالات تريكوديرما والتى معظمها ينتمى إلى النوع *T. reesei* تنتج مضادات حيوية ذائبة ، مثل Trichodermin ، والذى هو يثبط تماماً نمو كثير من الكائنات الممرضة الفطرية التى أجريت عليها التجارب .

هناك سلالات أخرى من التريكوديرما تنتج Peptides مثل Alamethicin ، Suzukacillin و Trichorzianine ومضادات حيوية أخرى مثل Gliovirin ، Gliotoxin و Viridin ومركبات متطايرة مثل Pyrones ، كل هذه المركبات لها تأثير نشيط وفعال ضد الفطريات عندما تكون موجودة مع الفطريات الممرضة النباتية .

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

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

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

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

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

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

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

سلالات الفطر تريكوديرما لديها أكثر من ميكانزم فى انتاج المضادات الحيوية ، وهذ يؤدى إلى تنوع المضادات الحيوية المنتجة ، وبالتالى من الصعوبة بمكان ، أن يظهر سلالات من الكائنات الممرضة مقاومة لجميع هذه المضادات المنتجة ، بالإضافة إلى أن سلالات التريكوديرما لا تعتمد كلية فى عملها على المضادات الحيوية ، بل هناك ميكانزمز أخرى تستعملها فى مقاومة الكائنات الممرضة النباتية .

٤ - التطفل الفطرى Mycoparasitism

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

يقسم التطفل الفطرى إلى قسمين من حيث التغذية :

١ – تغذية على مواد ميته Necrotrophic parasitism .

٢ – تغذية حيوية Biotrophic parasitism .

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

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

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

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

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

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

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

تحسين سلالات التريكوديرما كعوامل مقاومة حيوية

Improvement of Trichoderma Strains As Biocontrol Agents

مقدمة :

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

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

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

١ - تحسين كفاءة الهيدروليتك Improvement of The Hydrolytic Capacity

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

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

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

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

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

٢ - تحسين انتاج المضادات الحيوية Improvement of Antibiotic Production

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

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

٣ - تحسين مقاومة سلالات التريكوديرما للمبيدات الفطرية

Improvement for fungicide Resistance

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

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

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

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

طرق استعمال التريكوديرما :

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

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

هناك ثلاثة أشكال يحضر عليها فطر التريكوديرما :

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

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

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

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

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

عند استعمال المحضر التجارى Pyrax (مخلوط من Alginate مع الفطر *T. virens*) وأضافته فى خطوط الزراعة ، فإنه يمنع أصابة بادرات القطن بالفطر *R. solani* . عند استعمال Pyrax بنسبة 10^{3} كونيددية/كيلو غرام تربة ، فإنه يحفظ نباتات الفاصوليا من الإصابة بالفطر *S. rolfsii* . يمكن أن يستعمل المحضر التجارى مخلوطاً مع الأجزاء النباتية (مثل الدرنات ، العقل وغيرها) وذلك لوقاية النباتات من الإصابة بالفطر *R. solani* أو فيرتسليم . كذلك يمكن أن يستعمل رشاً على الأجزاء الخضرية فى النبات ، وذلك بعد عملية التقليم لحفظ النباتات من الإصابة عن طريق الجروح . هذا التحضير يكون بنسبة (١-٢) × 10^{5} جرثومة كونيدية/مل ماء ، يمكن أن يضاف إلى المعلق مادة لاصقة وذلك حسب سطح النبات .

دور انزيم Protease المفرز من قبل *T. harzianum* فى مقاومة الفطر *Botrytis cinerea*

مقدمة :

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

الجلوكوز، وبالتالى فإنه لا يستحث بوجود الجلوكوز. كذلك وجد أن نشاط بروتييز الفطر *T. harzianum* يزداد عندما تحتوى البيئة الغذائية السائلة مصدر نيتروجين عضوى . ولقد ذكر أن البروتييز هذا ، يتدخل فى تحطيم جدر خلية الكائن الممرض وكذلك الأغشية الخلوية وحتى البروتينات المنطلقة نتيجة تحلل الكائن الممرض وبالتالى توفر مواد غذائية للتطفل الفطرى .

دور الانزيم فى المقاومة الحيوية :

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

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

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

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

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

إن مثبطات البروتييز التى هى :

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

2 - antipain hydrochloride

3 - Mixture of inhibitors

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

المركبات المضادة الفطرية الذى يفرزها *R. solani* ضد الفطر *T. harzianum*

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

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

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

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

تحسين كفاءة *T. harzianum* فى المقاومة الحيوية لأمراض بعض الأعشاب

تعتبر السلالة 22-1295 من الفطر *T. harzianum* عامل مقاومة حيوية عالى الكفاءة لعديد من الأمراض الفطرية . وجد أن استعمال المعلق الجرثومى لهذه السلالة ، رشاً على النباتات العشبية ، يخفض بشكل معنوى أمراض ، عفن الجذور ، البقعة البنية ، والبقعة الدولارية فى الأعشاب الزاحفة فى الصوبا الزجاجية والحقول العامة . تكون المقاومة أفضل عندما يضاف Triton X-100 بنسبة ٠,١ ٪ إلى محلول المعلق المائى .

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

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

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

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

المعاملة	التجمعات فى الرايزوسفير		التجمعات على المجموع الخضرى	
	تربة معقمة	تربة طبيعية	تربة معقمة	تربة طبيعية
كنترول	$٢,٩ \times ١٠^{٣}$	$١,٨ \times ١٠^{٤}$	$٣,٦ \times ١٠^{٣}$	٦×١٠^{٤}
المعاملة بالحبيبات	$٢,٤ \times ١٠^{٥}$	١×١٠^{٥}	$٦,٧ \times ١٠^{٣}$	٧×١٠^{٤}
رشاً على الأوراق	١×١٠^{٥}	$١,٨ \times ١٠^{٥}$	٤×١٠^{٥}	٣×١٠^{٥}

ملاحظات على الجدول :

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

عزلات الفطر تريكوديرما المتطفلة على الفطر *Sclerotium rolfsii*

مقدمة :

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

نتائج الأبحاث :

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

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

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

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

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

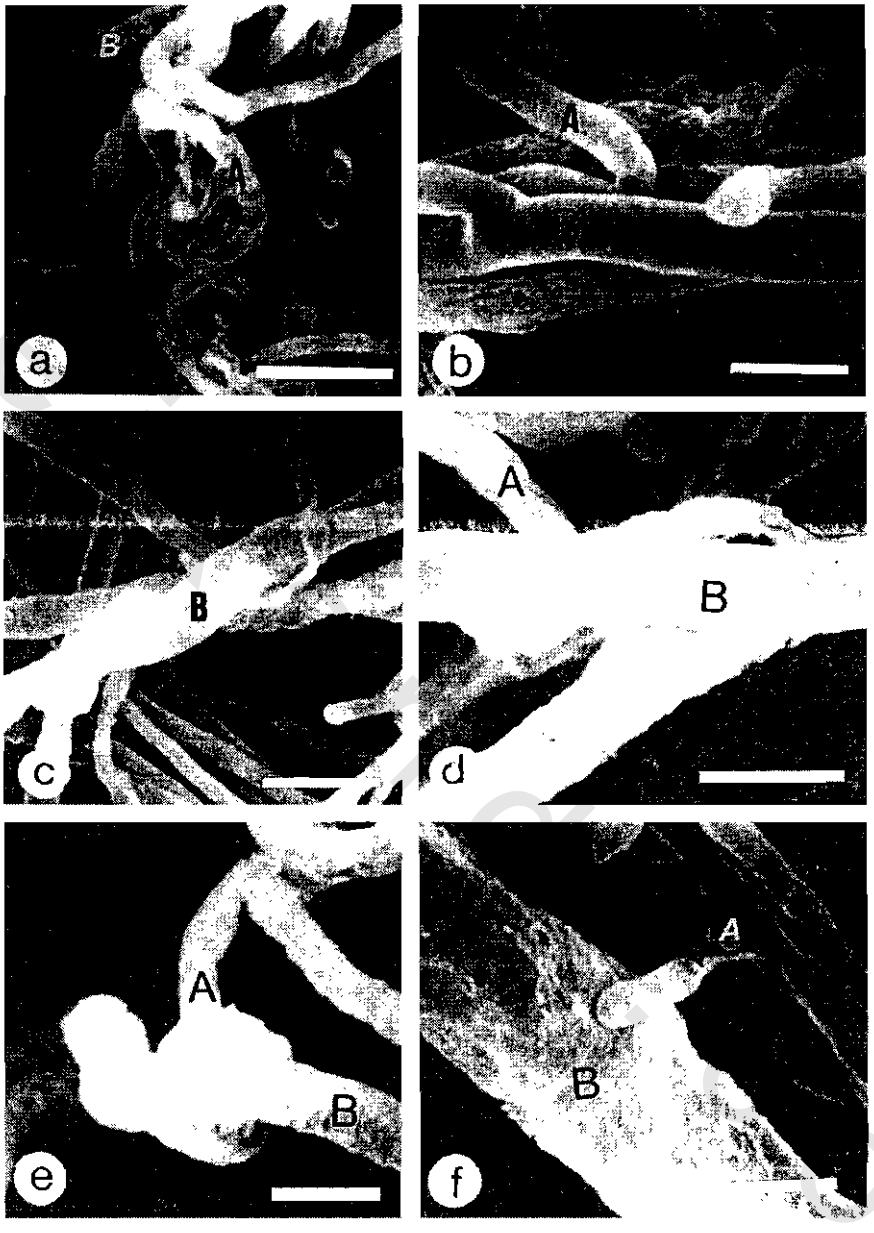
تطفل الفطر تريكوديرما على الفطر
Botryodiplodia theobromae

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

جدول رقم ٨٠ : تفاعل سلالات الفطر تريكوديرما مع الفطر *S. rolfsii* .

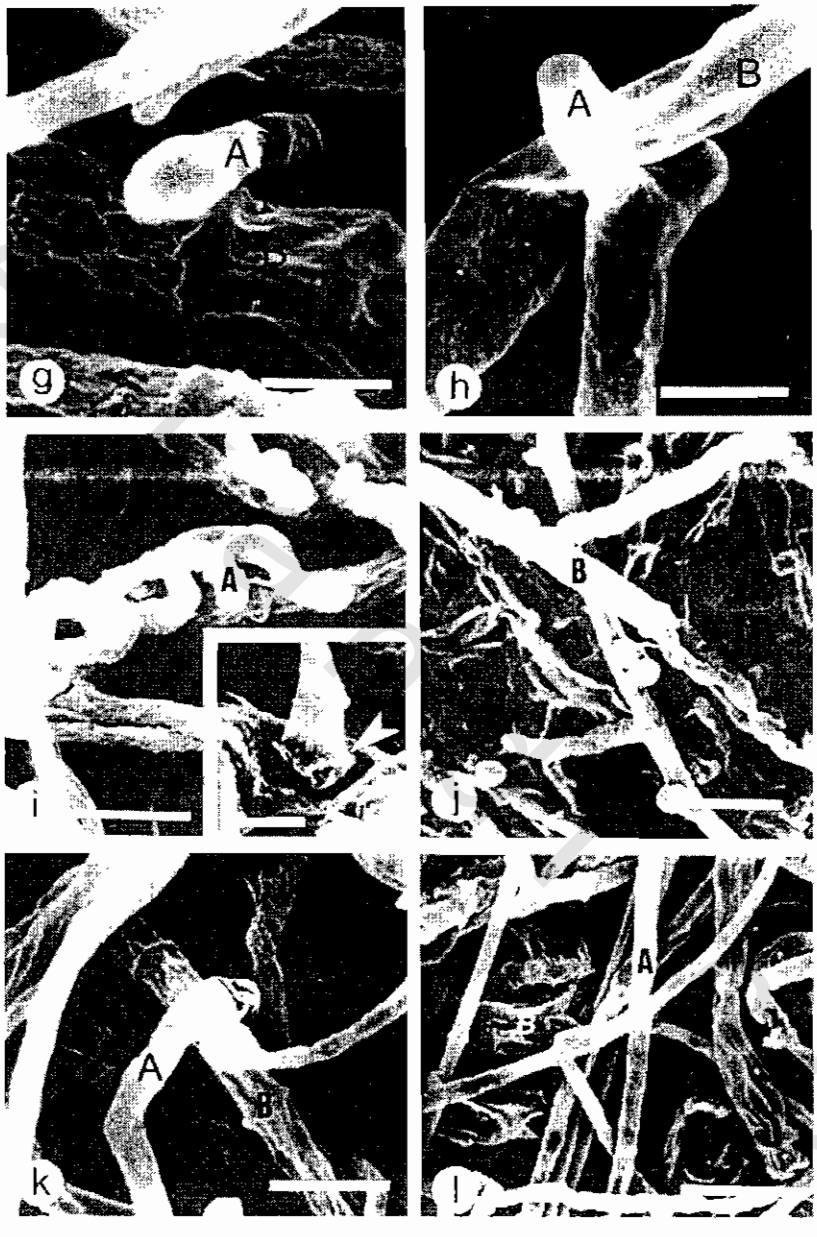
Isolate No.	*Trichoderma* spp.	التجارب المفضلة						% Sclerotia killed	Degree of maceration
		D	V	NV	BC	R	C		
T005	*T. harzianum*	-	+	-	-	+	+	0.0	S
T040	*T. harzianum*	-	-	-	+	-	-	100.0	VS
T126	*T. harzianum*	-	-	-	+	-	-	100.0	S
T127	*T. harzianum*	-	-	-	-	+	-	13.0	S
T165	*T. harzianum*	+	-	+	+	+	-	100.0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

* D : Dual culture; V : Volatiles; NV : Non-volatiles; BC : *Botrytis cinerea;* R : *Rhizoctonia*; C : Cold tolerance; : S : soft; VS : very soft : H : hard ; VH : Very hard.



شكل رقم ١٠ : دراسة بالميكروسكوب الالكترونى على تطفل الفطر تريكوديرما على الفطر

Botryodiplodia theobromae



تابع شكل رقم ١٠

توضيح الأشكال :

A : الفطر المتطفل : *Trichoderma sp.*

B : الفطر المتطفل عليه : *Botryodiplodia theobromae*

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

b : تركيب قصير يشبه الممص متفرع من نفس السلالة ملتصق مع هيفا الفطر المتطفل عليه .

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

e : هيفا Tv-3 ملتفة بكثافة حول هيفات الفطر المتطفل عليه مشكلة عقدة .

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

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

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

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

J : انفجار وتحطم هيفا الفطر المتطفل عليه بعد التداخل مع Th-2 .

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

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

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

II : الجنس Clonostachys

الفطر *Gliocladium roseum*

الاسم الجديد *Clonostachys rosea*

مقدمـــة

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 الأخرى ، 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 ودوره كعامل مقاومة حيوية .

الشكل الخارجى والتصنيف :

الفطر *G. roseum* الاسم المرادف *Nectria ochroleuca* ولقد وضع له اسم جديد هو *Clonostachys rosea* ، وهو من الفطريات الإسكية المسماة Hypocreales وواحد من الـ hyphomycete غير العادية ، 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 . 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 Domosch *et al* سنة ١٩٨٠ أن الفطر *G. roseum* يدخل فى الجنس *Clonostachys* واقترح بأن يشار إليه كمجموعة من الأنواع . ولقد وافقت لجنة تسمية الفطريات سنة ١٩٩٩ علي الاقتراح المقدم من قبل العالم السابق وأعطى هذا الفطر الاسم *Clonostachys rosea* .

البيئة :

الفطر *C. rosea* شائع الوجود فى الظروف البيئية المتطرفة غير العادية والمنحرفة عن الوضع الطبيعى ، فمثلاً يتواجد الفطر فى المناطق الأستوائية 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 والأراضى الساحلية ؛ خاصة تلك المتعادلة والقريبة إلى القلوية . يكون الفطر *C. rosea* غالباً مترافقاً مع حويصلات النيماتودا *Heterodera sp.* ، *Globodera sp.* وأنواع أخرى من النيماتودا فى التربة وكذلك مع الأجسام الحجرية للفطريات الآتية :

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 القرن الماضي ، فإن الفطر *C. rosea* قد حصل على شهرة عالمية كفطر متطفل mycoparasite على كثير من الفطريات .

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

اختيار الفطر *C. rosea* فى المقاومة الحيوية

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

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

الكائنات الدقيقة رمية التغذية ، الكائنات الممرضة الضعيفة والكائنات سطحية المعيشة وداخلية المعيشة غير الممرضة . تستعمل الكائنات الواقعة تحت الاختبار ، على نباتات الصوبا الزجاجية التى تفتقر إلى 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* إلى النباتات ، وأخيراً إعادة اكتشاف الكائنات الدقيقة ، فقط ، من أجزاء النسيج التى فشل الكائن الممرض فى التجرثم عليها ، إلا أن الفطر كان قد تم عزله مراراً من الأنسجة الحية والميتة تقريباً ، من جميع العوائل المختبرة .

بعد تطبيق الإجراءات العملية فى الاختيار من بين مئات الكائنات الدقيقة المختبرة ضد الفطر *B. cinerea* . تبين أن الفطر *C. rosea* ذو فعالية ضد الفطر الممرض *B. cinerea* على كثير من العوائل النباتية منها ، الفراولة ، العليق ، Black spruce ومدى واسع من نباتات 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 *C. rosea* كان مشابهاً أو أكثر فى فعاليته من تأثير المعاملات بالمبيدات الفطرية فى الأوراق ، القنابات الزهرية ، السيقان ، الأزهار والثمار ، وبالتالى فى هذه الأيام فإن الفطر *C. rosea* يستعمل تجارياً فى مقاومة أمراض *B. cinerea* فى الصوبات الزجاجية .

العوامل المؤثرة على كفاءة *C. rosea*

١ - طور نمو أعضاء العائل :

المرحلة التى تمر بها الأوراق ابتداء من أول امتدادها فى المراحل الأولى من النمو ، حتى الوصول إلى طور الشيخوخة ، بشكل عام ، تكون ذات تأثير بسيط على فعالية الفطر *C. rosea* ضد الفطر الممرض *B. cinerea* ، 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 (إذا حدثت) حيوياً

بصعوبة أو يصعب قياس نجاح المقاومة الحيوية فيها . فى العوائل الثلاثة المذكورة كانت كفاءة المقاومة الحيوية ٣٠-٧٠ ٪ أقل فى الأوراق 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 الأزهار . وبشكل عام فإن الأعضاء المختلفة فى الأزهار 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 الأزهار 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 *C. rosea* أو 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 *C. rosea* 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 - تركيز اللقاح :

إن معرفة تركيز اللقاح للفطر *C. rosea* وعلاقاتها فى مقاومة الفطر الممرض *B. cinerea* من الأساسيات المهمة لوضع أسس مناسبة لتوصيات استعمال المقاومة الحيوية فى أمراض 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 *C. rosea* يختلف حسب المحصول ووقت الاستعمال والمكان الذى يستعمل عليه ، سواء على المجموع الخضرى ، الازهار والثمار . وكما هو شائع فى التعامل مع الأمراض ، فإن الاعتماد على تركيز اللقاح للفطر *C. rosea* 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 إلى $١٠^{٦}$ جرثومة كونيدية/مل) ومن الفطر المضاد بتركيزات (من صفر إلى $١٠^{٨}$ جرثومة كونيدية/مل) ، فى جميع الاتحادات تم الحصول على مقاومة حيوية جيدة ، أساساً 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 $١٠^{٣}$ إلى $١٠^{٦}$ جرثومة كونيدية من الفطر الممرض/مل و $١٠^{٤}$ إلى $١٠^{٨}$ جرثومة كونيدية/مل من الفطر المضاد ، أما فى السيقان ، الأسدية والمياسم فقط عندما يكون تركيز الكائن المضاد ١٠ أو ١٠٠ ضعف تركيز الكائن الممرض . ومن غير المتوقع فإن الفطر المضاد على تركيز $١٠^{٨}$ جرثومة كونيدية/مل غالباً ما تكون أقل فعالية من تركيز $١٠^{٧}$ جرثومة كونيدية فى الأسدية والمياسم ، لوحظت أيضاً حالة واحدة فى المجموع الخضرى لشتلات البيسيه السوداء فى غرف الإنبات . 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 $١٠^{٧}$ جرثومة كونيدية/مل من الفطر المضاد يثبط بشدة الفطر الممرض بتركيز $١٠^{٦}$ جرثومة كونيدية/مل فى مختلف أعضاء نبات البيجونيا ، بخور مريم ، *Exacum* ، جيرانيم ، الجيربارا، الخيار، الفلفل، العليق، الفراولة، الطماطم وعوائل أخرى كثيرة. فى كل حالة فإن التركيز من الكائن الممرض كان كافياً ليحدث مرضاً خطيراً ومستمراً فى غياب الكائن المضاد.

إن تركيز اللقاح من $١٠^{٦}$ إلى $١٠^{٨}$ جرثومة كونيدية/مل من الفطر المضاد ، عادة ، يعطى مقاومة جيدة للفطر الممرض فى المحاصيل فى الحقل وفى الصوبا الزجاجية . اللقاح المحتوى $١٠^{٦}$ جرثومة كونيدية/مل من الفطر ، المضاد عادة ما يكون كافياً فى الفراولة ، البيجونيا ، وبخور مريم . أما تركيز $١٠^{٧}$ جرثومة كونيدية/مل من الفطر المضاد يعطى نتائج أفضل فى العليق ، أما تركيز $١٠^{٧} - ١٠^{٨}$ كان أقرب للوضع الأمثل للمقاومة الحيوية فى البيسيه السوداء .

وجد فى تجارب أخرى أن استعمال الفطر *C. rosea* بتركيز ٥ × $١٠^{٦}$ جرثومة كونيدية/مل تثبط مرض لفحة الأوراق المتسبب عن الفطر *B. squamosa* على البصل فى الحقل بنسبة ٥٠–٥٨ ٪ .

٣ - الحـــرارة :

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

٤ - الرطـوبة 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 *C. rosea* ، ليس لها تأثير كبير ، ولكن الدور الذى تقوم به ، يكون فى بقاء ، إنبات ونمو الفطر المضاد على سطوح النبات وفى عملية اختراق الفطر لسطح النبات . تفشل الجراثيم الكونيدية للفطر *C. rosea* فى الإنبات على المجموع الخضرى الجاف فى بادرات البيسيه السوداء فى 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 على عوائل أخرى . إن فترة الرطوبة ضرورية خلال الساعات الأولى من استعمال الفطر المضاد للحصول على أفضل نمو وأفضل مقاومة حيوية . أما فى الدراسات الحقلية ، تبين أن فترة الأمطار القصيرة (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 ، بالتالي تؤثر على كفاءة المقاومة الحيوية .

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

علاقة الفطر *C. rosea* مع أنسجة العائل :

تكون الجراثيم الكونيدية للفطر *C. rosea* قادرة على الإنبات فى توفر الرطوبة على سطح العائل وتنتج أنبوبة إنبات بسيطة ، وهيفا سطحية وتخترق الأوراق ، السيقان ، البتلات والأسدية 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 علي 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 . من الملاحظ أن الحوامل الكونيدية العنقودية (خصلية) والسوارية للفطر المضاد *C. rosea* تتكشف من هيفات سميكة سطحية على السيقان ، الأسدية والأوراق بعد ٣٢-٧٢ ساعة ، وتنتج أعداداً كبيرة من الجراثيم الكونيدية بعد ٤٠-٧٢ ساعة . 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 *C. rosea* بعد اختراقه المجموع الخضرى فى النبات والأزهار ، بشكل عام غير واضح ، سواء بقى محدداً 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 (محلياً) على الأقل لمدة ثلاثة شهور فى سيقان نباتات الطماطم النامية بقوة ، إلا أنه يستعمر

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

طرق عمل الفطر *C. rosea*

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 أن الكائن المضاد يستعمر ويستغل الأنسجة المتقدمة فى السن بسرعة أكبر مما يعمله الكائن الممرض *B. cinerea* ، وكذلك فإنه يعوق استعمار الأنسجة الحديثة من قبل الكائن الممرض . هذه الطريقة من العمل أساسية ، بسبب أنها تشارك فى تثبيط اللقاح للفطر الممرض . ونظراً لأن الكائن المضاد متطفل فطرى على كل من الهيفات ، الجراثيم ، الأجسام الحجرية والأجسام الثمرية لكثير من الفطريات الممرضة من ضمنها *B. cinerea* إلا أن Sutton *et al* سنة ١٩٩٧ أثبت أن هذه العمليات لا تتم كلها معاً فى الحقل لا على الأوراق فى نبات العليق .

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

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

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

هناك أنواع أخرى من الفطر *Gliocladium* تنتج مضادات حيوية مختلفة لها دور فى المقاومة الحيوية (شكل ١١) هذه المضادات هى :

١ – Viridin يفرزه الفطر *Gliocladium virens* .

٢ – Gliotoxin يفرزه الفطر *G. deliquescens* .

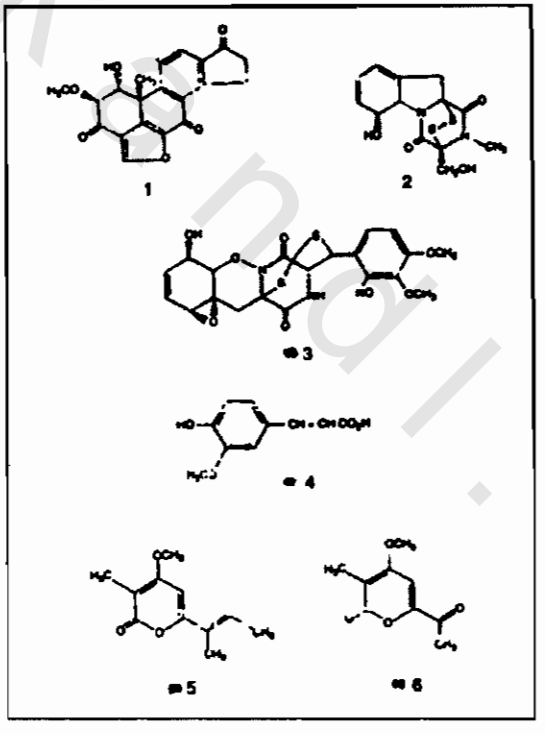
٣ – Gliovirin يفرزه الفطر *G. deliquescens* .

٤ – Ferulic acid يفرزه الفطر السابق أيضاً .

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

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

٧ – Nectriapyrone + vermopyrone يفرزه الفطر السابق أيضاً .



شكل رقم (١١) : 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 عملياً

حدث تقدم ملموس فى طرق تحضير اللقاح للكائن المضاد ، ووقت استعماله وكيفية استعماله ، وذلك للحصول على أعلى كفاءة فى المقاومة الحيوية باستعمال *C. rosea* ضد الفطر الممرض *B. cinerea* على كثير من المحاصيل . يمكن الحصول على لقاح الفطر المضاد *C. rosea* 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 × 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 محصولاً وفيراً من الجراثيم الكونيدية أكثر من انتاج الحوامل الكونيدية ذات الشكل السوارى ، حيث أن الحوامل الكونيدية السوارية تتكون عادة تحت ظروف الرطوبة العالية . بالإضافة إلى الجراثيم الكونيدية فإن أجزاء الميسيليوم من الفطر *C. rosea* يمكن عزلها من حبوب القمح بعد ١٥ يوماً ، حيث وجد أنها فعالة ضد الفطر الممرض *B. cinerea* فى الفراولة . الكونيديات المأخوذة من حبوب القمح يمكن تخزينها لمدة أكثر من سنة على حرارة ٣ – ٥ °م ، ولمد ٣ شهور على حرارة ٢٠ – ٢٣ °م دون أى فقد معنوى فى حيوية أو كفاءة المقاومة الحيوية التى تحدثها ، هذه المعلومات مهمة فى الانتاج التجارى للكائن المضاد . قبل استعمال الكائن المضاد على المحاصيل ، فإن الجراثيم الكونيدية لهذا الفطر يمكن أن تعلق فى ماء مضافاً إليه مطهر سطحى مثل *Triton x - 100* أو أنها تتشكل على شكل مسحوق مع بودرة التلك أو أى حامل آخر .

إن أفضل طريقة لاستعمال الفطر *C. rosea* تعتمد على نوع نسيج العائل الذى يتطلب الوقاية ، فمثلاً طريقة الرش ، تستعمل لإسقاط وترسيب القطيرات الصغيرة من اللقاح بانتظام علس 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 الأنسجة المستهدفة الخاصة . بالنسبة للجروح التى تحدث على

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

obeikandl.com

III : الجنس Cladorrhinum

مقدمـــة

الأبحـــاث الحديثة علـــى المقاومـــة الحيوية للكائنات الممرضة النباتية الكامنة فى التربـــة ، تجرى باستمرار وبتسارع مضطرد . يعود هذا التسارع جزئياً ، إلى زيادة المعرفة فى انـــتاج ، تشكـــيل وإعـــطاء أو استعمال عوامل مقاومة حيوية مختلفة والتى تشمل فطريـــات ، بكتيريـــا 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 إلى معهد الدراسات البيولوجية *(CBS)* تحت رئاسة الدكتور *W. Gams* فى هولندا ، صنف هذا الفطر على أساس أنه *Cladorrhinum foecundissimum* Sacc & Marchal .

تنمـــو مستعمـــرات هـــذا الفطـــر ، تنتشر بالعرض وتكون ذات خصل شعرية ولها ميسيليوم هوائـــى وتكـــون ذات لـــون رمـــادى إلى أرجوانى مصفرة ذهبية ، والتى أحياناً تشكل عناقيد من الهيفات الخضرية الشفافة . الجراثيم الكونيدية غير واضحة ، وتأخذ الشكل الإصبعى أو الكروى ، وذات حجم (٣–٣,٥) × (٢,٥–٣) ميكروميتر . يمكن أن يعزل الفطر من التربة أو من Buckwheat ، وقد وصف الفطر بأنه من ساكنات التربة ، إلا أنه من الصعوبة عزله من التربة نظراً لصعوبة إنبات الجراثيم الكونيدية على البيئات الغذائية المتوفرة .

لقد تبين أن لهذا الفطر نشاطاً فى أفراز 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)* أو لومية رملية طينية *(SCL)* . لكن اللقاح المحضن نفسه لمدة ٢٣ يوماً ، منع نمو الكائن الممرض من الانتقال من بذور البنجر إلى التربة . كذلك قد تم إيقاف النمو الترمى للفطر *R. solani* المضاف كمخلوط مع مجروش الذرة على المزارع بدون تربة soilless ، أيضاً قد تم إيقافه بواسطة العزلة *CF - 1* فى أربعة أنواع من الأراضى . كذلك هناك أربع عزلات أخرى من الفطر المضاد ، وهى : CBs- 182-66, CBS- 181-66, AT CC - 62373, CF-1 ، كلها تمنع النمو التطفلى للفطر *R. solani* فى أراضى *LS* عندما يكون لقاح الكائن الممرض موجوداً فى مخلوط Soilless ومزوداً بمجروش الذرة . الأفراد 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 أدى إلى 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 أعداد 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 إلى زيادة النباتات السليمة بالمقارنة مع تلك المزروعة فى مخلوط دون تربة ، خالياً من الكائن الممرض (جدول ٨١ ، ٨٢ ، ٨٣) .

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

نوع التربة	عمر اللقاح بالأيام	بقاء الفطر الممرض فى بذور بنجر ملوثة (دليل الاستعمار)	النمو الترمى للفطر الممرض من بذور بنجر ملوثة فى التربة (دليل الاستعمار)
لومية رملية (LS)	الفطر الممرض لوحده	٤,٤	٣,٦
	نخاله فقط	٤,٣	٣,٢
	صفر	٤,٢	٣,٥
	٣	٤,٣	٢,٣
	٦	٣,٨	٠,٦
	١٠	٤,٤	٠,٤
	١٧	٣,٨	٠,١
لومية رملية طينية SCL	الفطر الممرض لوحدة	٤,٣	٤,١
	نخالة واحدة	٤,١	٤,٠
	صفر	٣,٧	٤,٠
	٣	٣,٦	٢,٦
	٦	٤,٣	١,٤
	١٠	٤,٤	٠,٨
	١٧	٤,٦	٠,٨

ملاحظات على الجدول :

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

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

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

جدول رقم ٨٢ : النمو التطفلى للفطر الممرض *R. solani* العزلة *(R-23)* من لقاح مجروش الذرة المخلوط مع مواد غير عضوية فى تربة لومية رملية مضافاً إليها تحضيرات الفطر المضاد *C.foecundissinum* 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 رقم ٨٣ : 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 .

العزلة	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
CF-1	٠,٧	٨٧	٧٣	٧٣	٢١
CF-1	١,٣	--	--	٩٢	٨٩
CF-1	٢,٦	--	--	٩٢	٦٩
ATCC-62373	٠,٣	٩٤	٧٩	٤٧	١٨
ATCC-62373	٠,٧	٨٣	٥٧	٤٩	١٨
ATCC-62373	١,٣	--	--	٨٣	٥٦
ATCC-62373	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 الذي أضيف إلى 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 فى 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 أمراض النبات ، فهو يثبط ذبول الفير تسليم فى الطماطم ، الباذنجان والبطاطس ، ويتطفل على كل من *Sclerotium sclerotinia, R.solani, Sclerotium rolfsii* وبشكل عام فإن 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, β- 1,3 - glucanase, cellulase فى التضاد الحيوى . وجد أن الفطر *T. flavus* يضاد الفطر *verticillium dahliae* عن طريق التطفل والتضاد الحيوى ، ووجد أيضاً أن الأجسام الحجرية الدقيقة Microsclerotia للفطر الممرض *V.dahliae* ، يمكن أن تقتل براشح مزرعة الفطر المضاد *T.flavus* . هذه السمية التى يظهرها راشح المزرعة يمكن أن تعزى إلى 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 الإنزيمات 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 ، وهـــى Chitinase و β-1,3 - glucanase و Cellulase 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 الأخرى . ولقد تبين أن ظاهرة التطفل الفطرية بواسطة *T.flavus*

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

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

تعتبر ظاهرة تطفل *T.flavus* على الأجسام الحجرية للفطر الممرض *S.rolfsii* ميكانيكية مهمة فى تثبيط هذا الفطر وخفض المرض (شكل ١٢) . وقد وجد أن السلالة TFI-R6 لها قدرة عالية على التطفل الفطرى ، ووجد أنها تستعمر ٦٣ ٪ من الأجسام الحجرية للفطر الممرض ، بينما السلالات TF-62 و TF-46 لم تستعمر أى 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 10^{7} 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 أسابيع بعد الإنبات .

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

السلالة المستعملة	نوع الإنزيم				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 :

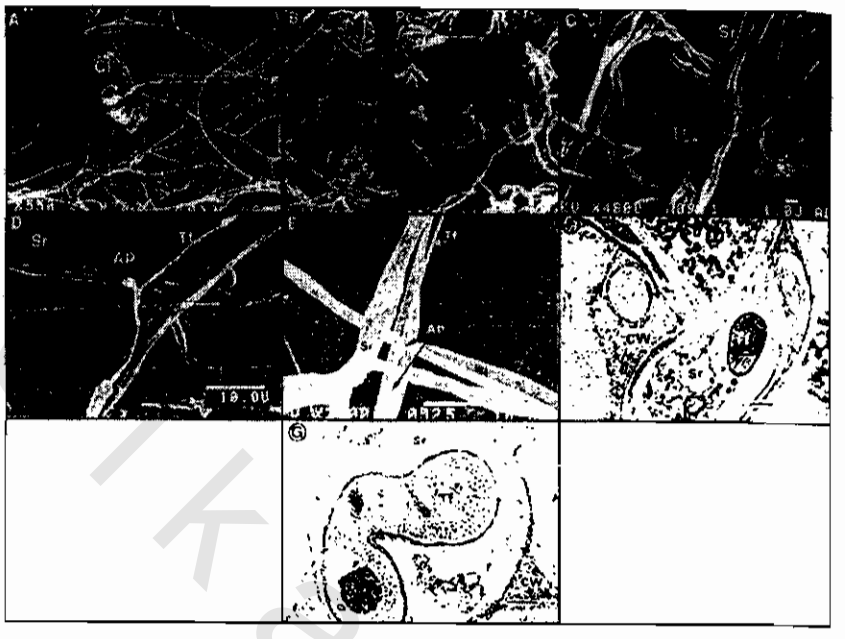
Chitinase = مكرومول من N-acetyl glucoseamine / ساعة/ملغم من البروتين.

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 وانتاج 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 السكريات الأحادية . أما انتاج الجراثيم الاسكية فيتم بعد ٦ أسابيع من النمو على بيئة صلبة وتحضينها على ٣٧° م . وجد أن أفضل مصدر غذائى هو السكريات القليلة التسكر oligosaccharides ؛ حيث تعطى ٢,٩ × ١٠^٨ جرثومة / ٥,٥ سم قطر بيئة فى أطباق بترى ، أما Monosaccharides فتعطى ١,٦ أو ١,٤ × ١٠^٨ جرثومة / ٥,٥ سم



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

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

B : تحضين الأجسام الحجرية المخقونة تحت الإضاءة المستمرة يؤدى إلى النموات الخضرية ، وتكوين بنسيليا عديدة (Pc) .

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

مقياس الرسم = ١ ميكروميتر .

فطر 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 إلى 10^{9} جرثومة أسكية لكل ٥,٥ قطر بيئة فى طبق بترى و $10^{-4} - 10^{-5}$ غرام من الهيفات الجافة لكل مل . وبشكل عام فإن مصدر النيتروجين ، الذى يؤدى لأفضل إنتاج من الجراثيم الإسكية يعطى أيضاً أفضل إنتاج من الهيفات الجافة . ولقد وجد أن عدد الجراثيم الإسكية يزيد كلما زادت نسبة *C/N* من ٥ : ١ إلى ٣٠ : ١ ، هذا التأثير يكون أكثر وضوحاً كلما كان C:N يزداد من ٥ : ١ إلى ١٥ : ١ . فى النسبة المنخفضة من *C:N* أقل من ١٥ : ١ فإن المعاملة بمادة hypoxanthine كمصدر للنيتروجين يؤدى إلى زيادة معنوية فى نمو ووزن الهيفات منه فى حالة المعاملة بترترات الأمونيوم . لا يوجد فرق معنوى عندما يكون *C:N* مساوياً أو أكبر من ١٥ : ١ .

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

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

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

ملاحظات على الجدول :

Correlation و Coefficient معتمدة على جدول (رقم ٨٤) .

الأرقام معنوية من صفر على P = 0.05 .

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

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

obeikandl.com

V : الجنس Aspergillus niger An 27

مقدمـــة

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

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

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

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

صفات الفطر Aspergillus niger AN 27

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

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

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

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

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

التركيبات التجارية للفطر Aspergillus niger AN 27

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

التجارب الحقلية على الفطر AN 27

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

١ - الشمام :

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

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

٢ - الأرز :

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

٣ - القرنبيط :

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

٤ - الخضار والفواكه :

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

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

٥ - البطاطس :

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

٦ - الذرة :

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

٧ - العصفر Safflower

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

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

تشجيع نمو المحاصيل :

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

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

2- Carboxy methyl 3-n hexyl maleic acid

والمركب الثانى 2- methylene -3- hexyl butanedioic acid

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

حقائق عن الفطر Aspergillus niger

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

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

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

٤ – لقد ذكر أن الفطر *A.niger* يسبب مرض لفحة البادرات فى القطن وفى الفول السودانى، إلا أن التجارب العديدة والدقيقة أثبتت أن نباتات القطن لا تظهر أية لفحة بادرات عند معاملة البذور بالمركب Kalisena SD بنسبة ٢ ، ٤ و ٦ ٪ بعد جمع المحصول وتهيئة التربة للمحصول القادم . لم يكن هناك أية اختلافات فى تجمعات *A.niger* (١–١,٥) × $١٠^{٧}$ وحدة تكوين مستعمرات/غرام تربة ، بين الحقول التى زرعت فيها البذور معاملة والتى زرعت فيها البذور غير معاملة . ولو أن الفطر *A.niger* يسبب لفحة بادرات فى الفول السودانى أو القطن ، لكانت المعاملة بالمركب Kalisena SD سبباً فى زيادة الإصابة ، وهذا لم يحدث مما يدل على أن الفطر بريئاً من هذه التهمة وبالتالى يمكن نقل السلالة AN 27 من قائمة الفطريات الممرضة إلى غير الممرضة .

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

أ – يستخدم هذا الفطر تجارياً لانتاج حمض السترك ، والذى يستعمل بكثره فى الطعام ، الكيماويات والصناعات الصيدلانية .

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

جـ – يستخدم الفطر *A.niger* تجارياً لانتاج إنزيمات مهمة فى التجارب الزراعية والصناعية.

د – يلعب الفطر دوراً مهماً فى إذابة الفوسفات .

هـ – للفطر دور فعال موجب فى علاقته مع فطريات الميكورهزا نوع arbuscular وبالتالى يشجع نمو النبات وقوته .

VI : الجنس Pythium Oligandrum

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

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

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

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

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

ثانياً : الأجناس البكتيـــرية

I : الجنس Pseudomonas

مقدمـــة

أفراد هذا الجنس بكتيريات على شكل عصيات مستقيمة ، إلى منحنية ، ذات أبعاد (٠,٥ – ١) × (١,٥ – ٤) ميكرون ، متحركة بواسطة سوط واحد أو أكثر . يوجد أنواع كثيرة من هذا الجنس شائعة كمستوطنات تربة أو الماء النقى أو مع الأحياء البحرية . معظم الأنواع الممرضة من هذا الجنس تصيب النبات ، قليل منها يصيب الحيوان أو الإنسان .

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

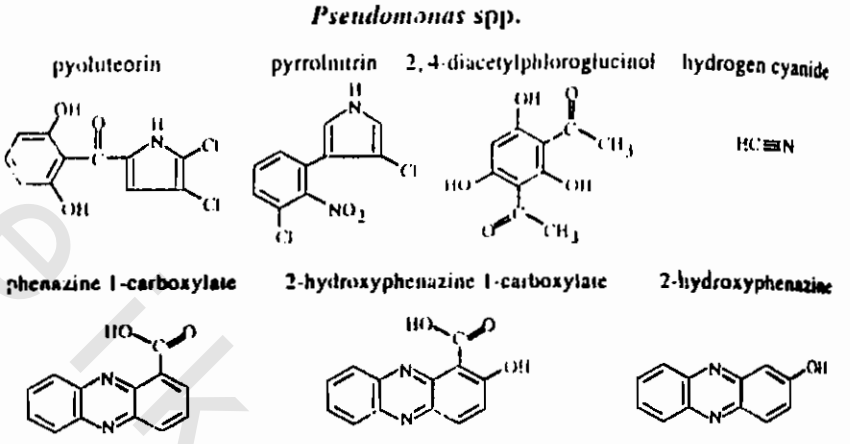
أهم الأنواع التى تدخل فى المقاومة الحيوية لأمراض النبات هى *Pseudomonas fluorescens* خاصة السلالة *CHAO* . والنوع الثانى *P.putida* والثالث *P.aevuginosa* .

السلالة *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 الانتاج فى المحاصيل الزراعية . يكون تثبيط الكائنات الممرضة التى تهاجم الجذور ، عن طريق انتاج مواد تسمى مضادات ميكروبات أو مركبات حديد مخلبية *Iron - Chelating metabolites* . هذه المواد يعتمد عليها فى الميكانيكية الأساسية فى تثبيط الأمراض بواسطة هذه البكتيريا . أهم المواد التى لها دور فعال فى تثبيط الأمراض هى :

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

يبين (شكل ١٣) الصيغ الكيميائية لبعض هذه المركبات :



شكل رقم (١٣) : بعض المركبات 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 منها وميض معين ، وتنتج سايدروفورز خضراء مصفرة يطلق عليها Pyover- (Pvd) dines أو تسمى Pseudobactins . السايدروفورز تجعل الحديد تركيباً معقداً مع التربة ؛ مما يجعله أقل توفراً للكائن الممرض . إن الدليل على دخول الـ (Pvd) فى تثبيط الأمراض ، قد جاء من الدراسات التى أجريت على تنقية الـ Pvd (مقارنة مع مركبات الحديد المخلبية والطفرات السالبة لـ Pvd) .

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

عزلت البكتيريا *P.fluorescens CHAO* ، أصلاً من تربة مثبطة لمرض العفن الأسود لجذور الدخان ، حيث وجد أنها 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 ١٩٦٩ ، أهم هذه النواتج هما HCN و Phl حيث يساعدان فى تثبيط العفن الأسود فى الدخان . كذلك وجد أن الـ Phl 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 المفاجئ ، إلا أن هناك أدلة واضحة تبين أن دخول Pvd المذكور سابقاً فى المقاومة الحيوية لأمراض الجذور غير أكيد . كذلك فإن السلالة CHAO تنتج أيضاً Pch و SA ولكن دورهما فى تثبيط الأمراض لم يدرس جيداً .

إن الجين الكروى المنظم Global activator والذى يطلق عليه Gac A فى السلالة المذكورة سابقاً ، ينظم سلوك عديد من نواتج التمثيل الثانوية من HCN ، Phl و Plt وإنزيمات Tryptophan side-chain oxidase ، وأنزيم Protease و Phospholipase C . إن جين تنظيم الاستجابة Gac A وجين تطابق الإحساس Lem A هما مكونان مهمان فى الجنس *Pseudomonas* . إن الجين Gac A غير مطلوب لانتاج مركبات الحديد المخلبية فى السلالة CHAO ، ولكن فى الطفرات السالبة لانتاج Gac A من *P.fluorescens* سلالة BL 915 ، فإنها تفشل فى بناء عديد من عوامل المضادات الفطرية مثل HCN و Pyrrolnitrin ، وتضعف كفاءتها فى تثبيط الأمراض . أيضاً وبطريقة مماثلة فإن الطفرات السالبة لانتاج Gac A من السلالة CHAO، تكون مقدرتها على تثبيط عفن الجذر الأسود فى الدخان منخفضة بشدة بالمقارنة مع السلالة الأصلية موجبة الانتاج 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 انتاج 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 لانتاج Gac A تستطيع أن تقى نباتات ذات الفلقة الواحدة وخاصة النجيليات مثل القمح والذرة من سقوط البادرات والذى يتسبب عن الفطر السابق نفسه . وتحفظ القمح من الإصابة بالمرض الماحق . وعلى أية حال فإن الطفرات السالبة فى انتاج Gac A ، تنتج كثيراً من Pch و Pvd . للحصول على تفسير أكبر للوقاية من المرض الذى يتم بواسطة السلالة السالبة لـ Gac A ، يجب دراسة الطفرات الثنائية السالبة فى انتاج Gac A و Pvdمثل السلالة CHA-496 التى أنشئت عن طريق الإحلال الجينى .

تنتج السلالة CHA-496 كميات كبيرة من Pch و Sal بالمقارنة مع السلالة CHAO، وتحفظ القمح من الإصابة بالفطر *P.ultimum* و *Gaeumannomyces graminis* مسبب المرض الماحق في القمح (جدول رقم ٨٧) ، بينما نبات الـ Cress والخيار لم يمكن حفظهما . إن إضافة كلوريد الحديديك يكبح انتاج 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 / أو Sal تكون داخلة فى مقدرة الطفرة المزدوجة السلبية فى انتاج Pvd و Gac A من السلالة CHAO لكبح أمراض جذور العائلة النجيلية .

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

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

إن إدخال Cosmid pME 3090 إلى البكتيريا الوميضة سلالة CHAO التى هى عامل مقاومة حيوية جيد ، ضد أمراض نباتية مختلفة ، متسببة عن كائنات ممرضة كامنة فى التربة، يضاعف انتاج المضادات الحيوية الناتجة عن التفاعلات الأيضية بمقدار ٣ – ٥ أضعاف ، هذه المضادات هى Plt و Ph1 فى المعمل . السلالة CHAO/pME 3090 ، أيضاً تنتج كمية كبيرة من الـ Plt و Ph1 فى منطقة الرايزوسفير فى القمح المصاب أو غير

المصاب بالفطر *P.ultimum* . إن كفاءة المقاومة الحيوية ، للسلالة الأصلية والسلالة المركبة قد تم مقارنتهما باستعمال اتحادات من العائل – الكائن الممرض المختلفة فى نظام الجينوتايب . لا تتأثر وقاية القمح بالانتاج الكبير من المضادات الحيوية ، لا الوقاية ضد *P.ultimum* ولا ضد فطر المرض الماحق *G.g.tritici* ولا يتأثر نمو نبات القمح . وبالمقابل فإن السلالة المركبة CHAO/pME 3090 أظهرت زيادة كبيرة فى وقاية الخيار من مرض ذبول الفيوزاريوم وفطر *Phomopsis sclerotioides* بالمقارنة مع السلالة الأصلية *CHAO* . السلالات المنتجة كميات كبيرة من المضادات الحيوية ، تحفظ جذور نبات الدخان بشكل معنوى أفضل ضد الفطر *Thielaviopsis basicola* من السلالة الأصلية ، ولكن تخفض بشكل كبير نمو نباتات الدخان ، وتكون سامة أيضاً على نمو نباتات الذرة السكرية . عندما تنمو السلالة المركبة على بيئة King's Bagar أو مولت آجار ، فإنها تثبط جميع الكائنات الممرضة بشكل أفضل مما تعمله السلالة الأصلية *CHAO* . إن 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 الأنواع النباتية أفضل من الكائن الممرض فى تحديد فيما إذا اكانت Cos-mid pME 3090 فى *P.fluorescens* السلالة CHAO تؤدى إلى تحسين المقاومة الحيوية وتثبيط المرض (جدول رقم ٨٨) .

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

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

ملاحظات على الجدول :

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

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

١ – سقوط بادرات الذرة قبل وبعد ظهورها فوق سطح التربة وذلك بالسلالة PHQM 100.

٢ – عفن الجلد النتن ، فى البصل ، بالسلالة المعزولة من جذور الذرة أما السلالة ATCC 25416 فهى تسبب المرض .

٣ – عفن جذور الفجل ، البسلة وعباد الشمس .

II : الجنس Bacillus

مقدمـــة

أفراد هذا الجنس بكتيريات عصوية هوائية أو غير هوائية اختيارياً . تكون جراثيم داخلية ، تتحرك عن طريق أسواط جسمية ، بعض الأنواع غير متحرك ، الجراثيم الداخلية بيضاوية أو كروية ، موجبة لصبغة غرام . بعض الأنواع مختلفة التفاعل مع هذه الصبغة ، موجبة لاختبار الكاتاليز . أنواع هذا الجنس غالبيتها رمية والبعض منها يصيب الحيوانات والحشرات مسبباً لها أمراضاً . النوع 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 انتاج 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). اختيرت هذه السلالة على أساس مقدرتها التثبيطية فى المعمل لعديد من الكائنات الممرضة ، وتبين أيضاً أنها تشجع نمو كثير من النباتات مثل الحبوب ، الذرة الرفيعة ، الجزر وغيرها ، عدن استعمالها حقناً فى البذور .

هناك سلالة مهمة أخرى هى *B.subtilis GBO-3* وهى تباع الآن فى الولايات المتحدة تحت اسم Kodiak لمقاومة مرض سقوط البادرات أساساً 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 و Camphell 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 المسماه *B.cereus var mycoides* المعزولة أساساً من

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

تعتبر أنواع الجنس *Bacillus* كمجموعة ، أقل فعالية وكفاءة 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 الانتاج ، عند إدخالها للتربة كمعاملة بذور ، على عديد من المحاصيل النباتية ، من ضمنها القمح والرز . ولقد ذكر Mavingui *et al* سنة ١٩٩٢ أن تجمعات *B.polymyxa* ، 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 .

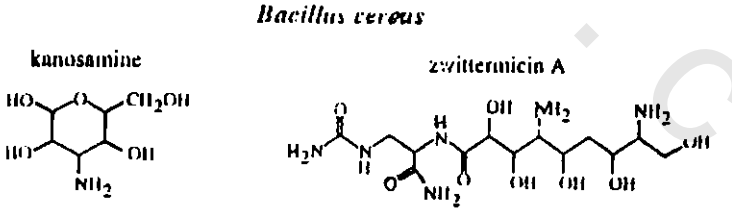
السلالة *B.cereus UW-85*

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

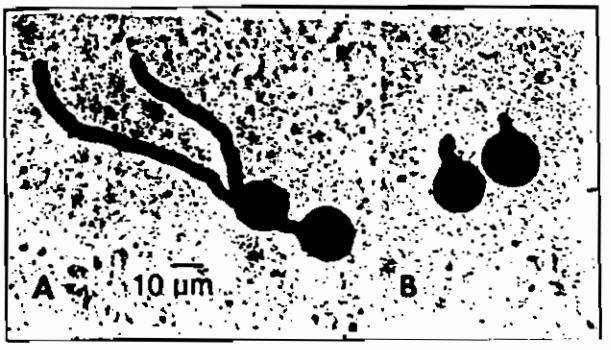
الفطر *Pythium aphanidermatum* ، والفول السودانى من الإصابة بالفطر *Sclerotinia minor* ، وهى أيضاً تزيد وتشجع نمو بكتيريا العقد الجذرية على فول الصويا ، وتسبب تغيرات حقيقية فى العلاقات البكتيرية على جذور فول الصويا .

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

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



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



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

أما بالنسبة السلالات الناتجة من الطفرات باستعمال Tn 917 أو مادة Mitomycin ، وجد أنه من بين ٢٦٨٢ طفرة ، هناك خمس طفرات فقط ، تخفض تجمع المضادات الحيوية وذات نشاط عال 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 رضافة المضادات – سواء الأول أو الثانى – إلى نباتات البرسيم الحجازى ، المحقونة بمزرعة طفرة غير مثبطة للمرض ، يؤدى إلى تثبيط المرض . هذه النتائج تؤدى إلى القول بأن البكتيريا *B.cereus UW-85* تفرز نوعين من المضادات الحيوية ذات تأثير مطهر للفطريات Fungistatic ، والتى تشارك فى تثبيط مرض سقوط بادرات البرسيم الحجازى .

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

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

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

ملاحظات على الجدول :

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

جدول رقم (٩٠) : تأثير المضادات الحيوية على تثبيط مرض سقوط البادرات ، هذه المضادات مفرزة بواسطة الطفرةUW030 .

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 تحتوى ٣ بذور ، والنتيجة مأخوذة من ٥٤ بادرة . الكنترول كلها سليمة ، Pm تعنى ٣×١٠^{٣} جرثومة هدبية من الفطر الممرض أضيفت إلى كل أنبوبة اختبار . Trypticase Soy broth = *TSB* ، *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 انتاجية كل من الجزر ، الشوفان ، الفول السودانى . تباع هذه العزلة فى السوق لمعاملة بذور الفول السودانى تحت الاسم التجارى Quantum-4000 . يعزى تحسن نمو النبات إلى تثبيط الكائنات الممرضة الرئيسية أو الثانوية ، ويمكن أيضاً أن يرجع إلى التشجيع المباشر لنمو النبات .

أما العزلة AF-1 ، كان أول عزل لها من الخلايا المتحللة للفطر *Sclerotium 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 بأنها 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 ammonisa فى البادرات المبكترة ، هذا يدل على إمكانية تدخل المقاومة المستحثة فى النبات العائل فى مقاومة الأمراض التى تستعمل فيها *AF-1* . إن مقدرة البكتريا *B.subtilis* على استعمار الجذور باستمرار ، والبقاء حية لمدة طويلة عند إدخالها فى منطقة الرايزوسفير / الرايزوبلين لنبات الفول السودانى ، له أهمية كبيرة ، وذلك لأنها يمكن أن تبقى حية لتكوين لقاح ناجح باستمرار تحت مدى واسع من الظروف .

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

متبوعاً بتكوين جراثيم . التحضيرات الميسيليومية من الفطر *A.niger* عند إضافتها كمصدر 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 إلى 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 فطري شبيهة بالمضادات الحيوية. كذلك فإن السلالة *AF-1* عندها المقدرة على خلق مقاومة مستحثة فى العائل فى بعض أنواع البسلة والفول السودانى ، بالإضافة إلى 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 البكتيريا فى المقاومة الحيوية ، وهى تحليل جدر خلايا الفطر الممرض ، كما يحدث فى مقاومة الفطر المسبب للمرض الماحق في 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 لأن تثبيط نمو الجدار الخلوى يكون سهلاً فى الأطوار الأولى من النمو (جدول ٩١) . إن نمو البكتيريا *AF-1* على التحضيرات الميسيلومية للفطر *A.niger* يؤدى إلى القول بأن هذه السلالة عندها القابلية لانتاج 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 وقف نمو الفطر المذكور .

لقد ذكر فى مراجع كثيرة ، أن الكائنات الحية الدقيقة القادرة على تحليل الكائنات الأخرى ، 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 (٩١) : 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* فى الصوبات الضبابية

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

obeikandl.com

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

إن البكتيريا Cot-1 قادرة على منع حدوث مرض سقوط البادرات المتسبب عن كل من *Pythium* و *Phytophthora* فى كثير من النباتات مثل *Astilbe* ، *Photinia* ، *Hemer-ocallis* وبادرات الجنس *Brassica* تحت ظروف الرطوبة العالية جداً ، وفى الصوبات الزجاجية الضبابية . بالنسبة للـ *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 × 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 × ١٠^٦ و ٣ × ١٠^٥ وحدة تكوين مستعمرات / غرام *RFW* فإن أعداد الجرائيم 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 إلى القول بأن النشاط الضعيف للمقاومة الحيوية ، يكون بسبب انطلاق مركبات مثبطة بواسطة جذور *Daphne* (جدول رقم ٩٢ ، ٩٣) .

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

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

بعض هذه الكائنات تستعمل على نطاق تجارى واسع مثل *B.subtilis* فى القطن وسلالات الفطر *Gliocladium* فى نباتات أخرى . وعلى أية حال فإن توفر هذه الكائنات المضادة يغطى الاحتياجات المطلوبة للوقاية بنسبة كبيرة ويساهم فى وقاية النباتات بصفة تجارية .

جدول رقم (٩٢) : تأثير استعمال البكتيريا B.subtilis Cot-1 **على مرض سقوط البادرات فى بعض النباتات.**

النبات	٪ سقوط بادرات بالفطر بثيم عند استعمال			٪ سقوط بادرات بالفطر فايتوفثورا عند استعمال			٪ سقوط بادرات من مخلوط فطريات ممرضة عند إستعمال		
	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 $١٠^{٢}$ جرثومة/غم بيت. المخلوط يستعمل فيه ٥ × $١٠^{٢}$ جرثومة بيضية / غرام بيت .

جدول رقم (٩٣) : 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)			
		$١٠^{١}$	$١٠^{٢}$	$١٠^{٣}$	$١٠^{٤}$
مبيد ميتا ليكسايل	--	٦	٢	٦	٣
Cot - 1	$١٠^{٩}$	٦	٧	١٤	٦١
Cot - 1	$١٠^{٨}$	٢	٦	٥٤	٦٩
Cot - 1	$١٠^{٧}$	٢٠	٧٤	٩٧	٩٥
Cot - 1	$١٠^{٥}$	٩٥	٩٤	٩٦	٩٨
كنترول	--	٩٤	٩٩	٩٦	٩٨

III : الجنس Streptomyces

مقدمـــة

تتميز أفراد هذا الجنس ، بأن لها هيفات متفرعة رفيعة دون جدر عرضية ، يتراوح قطرها حوالى ٠,٥ ٢٠ ميكرون . عند اكتمال النمو ، يكون الميسيليوم الهوائى سلاسل جراثيم من ثلاثة إلى عدة جراثيم فى كل سلسلة . كذلك فإن أفراد هذا الجنس تكون مستعمراتها على البيئة الغذائية بحجم صغير (١ – ١٠ ملم) فى القطر . تكون المستعمرات فى البداية ذات سطح ناعم إلى حد ما ، ولكن بعد ذلك فإن ما ينتج من الميسيليوم الهوائى ، يمكن أن يظهر المستعمرة بشكل حبيبى أو مسحوقى أو مخملى . تكون الأنواع المتعددة والسلالات المتعددة من هذا الجنس صبغات مختلفة كثيراً ، 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 ، شيتينيز ، أمليز ، جلوكاينز ، هيميسليوليز 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 Raddi & 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 الـ *Streptomyces* علي 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 الكائن المضاد المذكور فى التربة . هناك كثير من الدراسات قد أثبتت الأهمية الكمية والنوعية لأنواع الجنس *Streptomyces* فى منطقة الرايزوسفير ؛ حيث إنها من الممكن أن تعمل كمشجعات نمو نباتية ، بالإضافة إلى استعمار الجذر حتى لو كانت بتركيز $^{٢}١٠$ – $^{٥}١٠$ وحدة تكوين مستعمرات من بين السلالات البكتيرية فى منطقة رايزوسفير القمح .

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

طرق فعل الجنس Streptomyces فى المقاومة الحيوية :

١ – يمكن أن يقوم الجنس *Streptomyces* بتثبيط نمو الجراثيم ، كما فى حالة الفطر *Helminthosporium sativum* ، أو عن طريق تحليل ميسيليوم الفطر الممرض .

٢ – عن طريق التطفل على الكائن الممرض .

٣ – عن طريق إفراز مضادات حيوية ، حيث إن *Streptomyces cinnamomeus* ، لديه كفاءة عالية فى انتاج المضادات الحيوية فى المعمل ، وتؤثر على كثير من الفطريات الممرضة للنبات . من أهم هذه المضادات Polyenes ، Cinnamycin ، وهى مركبات عديدة البروتين Polypeptide تنتج بواسطة *S.cinnamomeus f.sp.cinnamomeus*. كذلك فإن المضاد الحيوى Heptanes من أكثر المضادات فعالية حيث تفرزه أنواع أخرى من الجنس نفسه . أما النوع *S.hygroscopicus var geldanus* فإنه ينتج المضاد الحيوى Geldanamycin ذو تأثير فعال ضد عديد من الممرضات النباتية الفطرية.

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

1 - Hemipyocianine

2 - Chlororaphin

3 - Phenazine - A

4 - Carboxylic acid

5 - Phenazine - B

الفطريات التى تقاوم حيوياً باستعمال أنواع الجنس *Streptomyces*

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

٢ – *Pythium sp.* مسبب عفن جذور نباتات قصب السكر والذرة ، معاملة عقل 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 أو الجذور أو البادرات فى معلق متجانس من *S.ochracei scleroticus* يقاوم بنجاح ذبول الفيرتسليم فى القطن بنسبة ٧٣,٩ ٪ ، وفى الفلفل ٧١,٤ ٪ ، وفى الباذنجان ٧٤ ٪ ، وذبول فيوزاريوم الطماطم بنسبة ٧٣,١ ٪ ، ذبول البطيخ ٨٦,٤ ٪ ، ذبول 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 أنواع *Strepto-myces* 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/١٠م^{2} ، 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 ثابتاً لمدة ٢-٤ أسابيع عندما تخزن البذور المعاملة فى ظروف جافة . يبين (جدول ٩٥) قائمة بالفطريات التى تقاومها أنواع مختلفة من الجنس *Streptomyces* .

تأثيرات الجنس *streptomyces* على النبات العائل :

إن طرق مقاومة أمراض النبات المختلفة ، بما فيها استعمال عوامل المقاومة الحيوية ، تسبب زيادة فى نمو النبات ، هذه الزيادة ، تعزى إلى 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 بأن 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 graminico-la* فى تربة معاملة بمضادات حيوية غير نقية ، من الجنس *Streptomyces* ، 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 بأنواع من الأكتينومايستس مضادة أو ضعيفة التضاد فى التربة نفسها التى تنمو فيها النباتات ، تؤدى إلى زيادة كبيرة فى النمو أكثر من تلك المعاملة بالأكتينومايستس شديدة التضاد المأخوذة من تربة أخرى . كذلك وجد أن بعض الكائنات المضادة أو راشح مستعمراتها يكون له تأثير سام على النبات ، ويثبط إنبات البذور أو نمو البادرات أو نمو النبات الكامل ، فى بعض النباتات .

لقد ذكر Turhan سنة ١٩٨١ أن السلالة C - 2 - 9 من الجنس *Streptomyces* لم يكن لها تأثير ضار على إنبات البذور أو نمو البادرات أو النباتات المعاملة بها ، بل بالعكس فهى تحسن مظهر النبات ويكون انتاج 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 *Streptomyces* ، لا تزيد فى انتاج الشعير فقط ، بل تزيد فى انتاج القمح زيادة معنوية ، وهى تزيد بشكل عام ، إنتاج النجيليات ، الخيار والقرنفل فى التجارب الحقلية بنسب تتراوح من ١٠ – ٣٠ ٪ . أما فى نباتات الخس زاد الانتاج 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 أو تحسناً فى نمو وانتاج معظم النباتات التى تعامل بها ، بغض النظر عن النوع البكتيرى المستعمل فى المقاومة أو الفطر الممرض .

جدول رقم (٩٤) : 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 أسبرجين		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 (٩٥) : 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.pseudotropocales	صفر	صفر	صفر
Cryptococcus neoformans	صفر	صفر	صفر
Trichosporon beigilli	صفر	صفر	صفر
Saccharomyces cereviseae	صفر	صفر	صفر

كفاءة السلالة *WYEC-108* فى 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 انتاج مضادات حيوية خارج الخلية ناتجة عن عمليات الـ 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 أو الميسيليوم المأخوذ منها ، على شكل غلاف لبذور البسلة ، فإن هذا يؤدى إلى 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. أما عند زراعة البذور المغلفة بوسائل المقاومة الحيوية فى التربة ، قبل إدخال الكائن الممرض إليها بمدة ٢٤ ساعة أو بعد إدخال الكائن الممرض إليها بمدة ٩٦ ساعة ، فإن أقل من ٢٥ ٪ من البذور النابتة تصبح مصابة (جدولا ٩٦ ، ٩٧) .

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

أثبتت الدراسات الحقلية أن هيفات أفراد السلالة *WYEC-108* عندها القدرة على الاستعمار والانتقال إلى أسفل مع الجذر كلما استطال . تحتاج هذه السلالة لفترة أطول من ٣٠ يوماً حتى يمكن للتجمعات البكتيرية أن تستعمر الجذور المستطيلة الناتجة عن البذور النابتة ، وتبقى ثابتة على تركيز 10^{5} وحدة تكوين مستعمرات/غرام فى منطقة الرايزوسفير ، بينما تنخفض التجمعات فى غير منطقة الرايزوسفير لهذه السلالة على الأقل بنسبة ١٠٠ ضعف (من 10^{5} إلى 10^{3}) أو أقل وحدة تكوين مستعمرات/غرام . جدول ٩٨ .

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 يوماً أو أكثر . عند وضع بذور كل من البسلة ، القطن ، والذرة السكرية فى تربة غير معقمة أو معقمة محتوية 10^{6} وحدة تكوين مستعمرات أو أكثر من السلالة نفسها/غرام ، فإنها تستعمر الجذور المستطيلة . بعد فترة نمو تصل أسبوع واحد فإن تجمعات هذه السلالة ذات تركيز 10^{5} وحدة تكوين مستعمرات/غرام وزن رطب من الجذور ، وجدت أنها لا تزال على جذور البسلة فى التربة المعقمة المعاملة ، وفى الظروف المعاكسة 10^{4} وحدة تكوين مستعمرات/غرام وجدت فى التربة غير المعقمة المعاملة .

أجريت دراسات أخرى على التفاعل فى المعمل بين السلالة المذكورة والفطر

P.ultimum ، حيث مزجت ميسيليومات السلالة المذكورة مع الجراثيم البيضية للفطر المذكور ، 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 الإلكترونى . أظهرت النتائج أن السلالة *WYEC-108* كانت قادرة ، ليس فقط ، على تحطيم الجراثيم البيضية النابتة للفطر *P.ultimum* ، ولكنها أيضاً قادرة على تحطيم جدر خلايا الهيفات الفطرية . تظهر هذه النتائج أن هذه السلالة ذات كفاءة عالية فى المقاومة الحيوية ، يمكن استعمالها فى مقاومة أمراض عفن الجذور والبذور المتسببة عن جنس *Pythium* .

جدول رقم (٩٦) : تأثير معاملة بذور البسلة والقطن بالسلالة *WYEC-108* من البكتيريا ستربتومايسز، على مرض عفن البذور ، سقوط البادرات ، الطول ، الوزن الطازج ، لنباتات البسلة والقطن المزروعة فى تربة محقونة صناعياً 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
تركيز 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 الممرض + سلالة البكتيريا	٣٢,١	١٠,١	٦٥	٣٢,١	١٢,٨	٦٤
تركيز مرتفع من الفطر الممرض + 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 (٩٧) : الاستعمال الأولى 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	$10^{5} \times 3,01 \pm 10^{5} \times 2,22$	$10^{5} \times 2,47 \pm 10^{5} \times 2,74$	$10^{3} \times 6,77 \pm 10^{3} \times 3,75$
غير معقمة	$10^{4} \times 9,78 \pm 10^{4} \times 6,29$	$10^{5} \times 5,2 \pm 10^{3} \times 4$	$10^{3} \times 3 \pm 10^{3} \times 1,5$

ملاحظات على الجدول :

كان يؤخذ المتوسط من خمس عينات . عند الزراعة كانت تجمعات *WYEC-108* = 1×10^{7} فى التربة المعقمة و $1,6 \times 10^{5}$ وحدة تكوين مستعمرات / غرام تربة غير معقمة . كانت تؤخذ عينات الجذور بعد سبعة أيام من الإنبات .

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

الكائن الممرض	البيئة الغذائية	التضاد بعد		القدرة على 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. psis 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 ألة الطرد المركزى على ٣٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ١٥ دقيقة ثم يؤخذ العائم ليكمل إلى لتر من بيئة V-8A

جدول رقم (٩٩) : 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 البكتيريا	كنترول	+ سلالة البكتيريا	كنترول	+ سلالة البكتيريا
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

IV : السلالة K-1026 من الجنس Agrobacterium المهندسة وراثياً ودورها فى مقاومة مرض التدرن التاجى

مقدمـــة

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

مرض التدرن التاجي Crown Gall Disease

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

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

تعتبر أنواع الجنس أجروبكتيريم من البكتيريا ساكنة التربة ، والتى تحدث إصابتها عن طريق الجروح فقط ، أو عن طريق العديسات ، وتستحث خلايا النبات لتتكاثر على شكل ورم . يتم الحصول على هذا الورم عن طريق نقل قطعة منفصلة من الـ DNA البكتيرى (تسمى T-DNA) إلى أنوية خلايا النبات ، حيث تتحكم فى الانتاج العالى لهرمونات النمو النباتية (الأكسينات والسايتوكاينينات) وبناء المركبات الغريبة الجديدة المسماه Opines . يتواجد الـ T-DNA على سلالات الـ tumorigenic للجنس أجروبكتيريم فى بلازمدز كبيرة ، تسمى البلازميدات المخلقة للوزم (Ti) . كما ذكر Kerr سنة ١٩٩١ فإن تخليق التدرن التاجى يشمل خطوات عديدة منها :

١ – الانجذاب الكيماوى للبكتيريا . يكون ناتجاً عن بعض المركبات الفينولية المفرزة من الأنسجة المجروحة .

٢ – التصاق وتثبت البكتيريا مع خلايا النبات .

٣ – حث جينات الشدة المرضية بواسطة مركبات الفينولات النباتية .

٤ – عملية الـ T-DNA والتى تنقل قطعة منفصلة من DNA البكتيريا إلى خلية النبات .

٥ – دمج الـ T-DNA فى جينوم النبات .

٦ – بناء T-DNA يشفر للهرمونات النباتية .

٧ – سرعة إنقسام خلية النبات لتكون ورم .

٨ – بناء Opines .

تكون هذه العملية متبوعة بنمو مميز للجنس أجروبكتيريم ، بسبب استخدام الـ Opines والنقل المحتمل لبلازمد Ti إلى خلايا بكتيرية أخرى مستحثة بواسطة Opines .

صفات السلالة K84

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

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

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

تحتوى السلالة K84 على ثلاثة بلازميدات طبيعية هى :

1 - pAgK 434 (pAtk 84 a ويسمى أيضاً)

وهو أكبر من 300kd ويعمل تشفير لانتاج الأجروسان 434 .

2 - pNoc (pAtK84 b ويسمى أيضاً)

ويعمل تشفير لـ Catabolism of nopaline وهو يساوى 173 kb

3 - pAgK 84

وهذا يساوى 47.7 kd والذى يشفر لانتاج ومناعة للأجروسان 84 .

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

المقاومة الحيوية باستعمال السلالة K84

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

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

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

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

أسباب فشل المقاومة الحيوية بالسلالة K84

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

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

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

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

سلالة الكائن الحى الدقيق المهندسة وراثياً K1026

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

فعالية السلالة K1026 فى المقاومة الحيوية

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

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

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

انتقال بلازمد اجروسين 84

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

تدل هذه المعلومات على أن هناك احتمالات عاليه ومتكررة لانتقال pAgK84 من K84 وكذلك تدل على غياب هذا الانتقال التزاوجى عند استعمال السلالة K1026 للمقاومة الحيوية لمرض التدرن التاجى فى ظروف مشابهة للظروف الطبيعية .

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

Country	Host	Challenge pathogen	Susceptibilty to agrocin 84	Treatment	Number of analyzed plants	% of plants with galls	Index of biocontrol efficiency[a]
Australia	Young almonds	K27	Susceptible	Untreated	12	100	
				K84	14	14	86
				K1026	12	25	75
	Old almonds	K27	Susceptible	Untreated	15	100	
				K84	15	20	80
				K1026	15	27	73
Jordan	Tomato	B4	Susceptible	Untreated	12	75	
				K84	12	0	100
				K1026	12	0	100

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

obeikandl.com

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

ملاحظات : دليل المقاومة الحيوية للتدرن الثانى = ١٠٠ ٪ – (٪ من المرض الحادث فى التجربة × ١٠٠ مقسوماً على (٪ من المرض الحادث فى الكنترول) . هذه المعادلة حسب ما ذكره Penyalver and lopez سنة ١٩٩٩ . n.a. = غير متوفر .

انتاج المضادات الحيوية بواسطة السلالة K1026

أجروسين 84 . 434 و ALS 84

إن انتاج السلالة K1026 للأجروسين 84 ، يدل على أن pAgK1026 يحتفظ بمراكز البناء الحيوى للأجروسين 84 من pAgK84 . زيادة على ذلك فإن كميات الأجروسين 84 المنتجة بواسطة السلالة K1026 تكون مشابهة لتلك المنتجة بواسطة K84 . هذا يؤدى إلى القول بأن pAgK1026 يحتفظ بعدة نسخ من جده الأعلى pAgK84 ، وأن ليس هناك محددات لثبات البلازمد قد حذفت . كذلك فإن السلالة K1026تنتج أجروسين 434 ، إلى حد ما ، كما هو الحال فى السلالة K84 ، نظراً لأن انتاج هذا الأجروسين يكون مشفر له على pAgK434 والذى هو موجود فى كلتا السلالتين . كذلك فإن ALS84 ينتج أيضاً بواسطة السلالة K1026 بنفس الكمية المنتجة بواسطة السلالة K84، نظراً لأن انتاجه يبدو أنه مشفر له كروموسومياً (هذه أبحاث Penyalver *et al* سنة ٢٠٠٠) .

استعمار الجذر والبقاء فى الرايزوسفير بواسطة السلالة K1026

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

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

كذلك فقد أمكن استرجاع السلالة K1026من الجذور بعد سبعة شهور من حقنها فى شتلات اللوز . زيادة على ذلك ، فإن دراسات المقارنة على مقدرة السلالة K84 والسلالة K1026 للبقاء حية فى الرايزوسفير ، قد أظهرت بأن كلتا السلالتين تبقى حية على مستويات تقارب 10^{6} وحدة تكوين مستعمرات لكل غرام من الجذر ، بعد ثمانية شهور من حقنها على الجذور فى النباتات الناتجة من تهجين (خوخ × لوز GF677) .

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

مناقشة الأسباب المحتملة لفشل المقاومة الحيوية بالسلالة K1026

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

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

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

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

الاستعمال التجارى للسلالة K1026

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

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

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

سجلت السلالة K1026 كمبيد حيوى Biopesticide فى أستراليا فى نهاية ١٩٨٨ ، وأصبحت أول كائن حى مهندس وراثياً GEM يستعمل تجارياً ويعرض للجمهور . يباع المنتج التجارى تحت اسم NOGALL (بدون أورام) بواسطة شركة Bio-Care فى أستراليا . ينتج هذا المحضر على شكل تركيبات محمولة على البيت Peat تحتوى على الأقل $^{9}10$ بكتيرية فى الغرام الواحد ، ذات سقف حياة يصل ستة شهور . انتشر استعمال هذا المبيد الآن فى الأسواق الأمريكية .

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

الأمان Safety

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

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

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

٣ – السلالة K1026 لا تحتوى على جينات مشفرة لبلازمد Ti داخلة فى تخليق مرض التدرن التاجى .

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

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

كلمة مختصرة عن الموضوع :

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

V : جنس البكتيريا Pantoea agglomerans

الاسم القديم Erwinia herbicola

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

١ – معاملة حبوب القمح بهذه البكتيريا يقيها من الاصابة بالأمراض الآتية :

1 - *Fusarium culmorum*

2 - *F. nivale*

3 - *Pythium ultimum.*

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

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

6 - *Pseudomonas syringae pv. syringae.*

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

٢ – فى الطماطم تقاوم الاصابة بالفطر *Alternaria solani* .

٣ – فى الفاصوليا تقاوم الإصابة بالفطر *Sclerotinia sclerotiorum*

٤ – فى وقاية بذور القطن من الإصابة بالبكتيريا

Xanthomonas campestris pv. malvacearum

٥ – فى وقاية الأرز من إصابة البادرات بالبكتيريا *Xanthomonas oryzae*

٦ – فى وقاية الفاصوليا الهندية من الإصابة *X. campestris pv. vingnaeradiatae*

٧ – فى وقاية التفاح من الإصابة بمرض اللفحة النارية المتسبب عن

Erwinia amylovera