

الفصل السادس

أهم أجناس الكائنات الحية الدقيقة المستعملة

في المقاومة الحيوية

أولاً: الأجناس الفطرية

I: الجنس *Trichoderma*

مقدمة

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

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

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

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

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

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

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

كفاءة الجنس في المقاومة الحيوية

١- معاملة تربة

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

بدأت المقاومة الحيوية التطبيقية في الحقل باستعمال الفطر *Trichoderma* بواسطة العالم *Well et al.* سنة ١٩٨٢، وذلك باستعمال تحضيرات من الفطر تريكوثيرما النامي على بيئة صلبة (حبوب، شيلم أو قمح) وذلك للمقاومة الحقلية للفطر الممرض *Sclerotium rolfii* على نباتات الطماطم. هذا النظام من المقاومة يحتاج كميات كبيرة من المواد العضوية لينمو عليها الفطر المضاد (٤٢٠٠ كغم/ هكتار) لمقاومة المرض. إلا أن العالم *Kabana* استطاع أن يستعمل بعض المواد الحبيبية غير الذائبة (الداياتومات) المخلوطة مع المولاس لتنمية الفطر المضاد *T.harzianum*، ثم تؤخذ هذه الحبيبات وتضاف على خطوط التربة المزروعة بالفول السوداني، وهذا يحتاج ١١٢ - ١٤٠ كغم/ هكتار، تنتشر هذه المواد بعد الزراعة بحوالي ٧٠ - ١٠٠ يوم، وهذا يؤدي إلى مقاومة ناجحة للفطر *S.rolfsii* وأدى إلى زيادة إنتاج الفول السوداني لثلاث سنوات متتالية. ولقد تبين أن مقاومة المرض بهذه الطريقة تعادل مقاومته باستعمال المبيد الفطري *PCNB*.

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

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

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

كذلك يمكن استعمال الجراثيم الكونيدية للفطر *Trichoderma* على شكل معلق تغمر فيه جذور شتلات الفراولة قبل زراعتها في الأرض الدائمة، وهذا يؤدي إلى خفض حدوث الأمراض لهذه الشتلات. كذلك تم الحصول على مقاومة ممتازة لذبول الفيوزاريوم في الاقحوان سنة ١٩٨٤، وذلك بإضافة مزيج من العلق المائي للجراثيم الكونيدية للفطر *T.viride* مع المبيد الفطري البنليت، حيث إن هذا البيوتايب الفطري مقاوم للمبيد بنليت. تستعمل جراثيم الفطر المضاد بتركيز ١٠^٤ 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) Fermen- tor Biomass والتي على شكل مسحوق وطين أو كرات من Alginate عند إضافتها إلى التربة، فإنها تتكاثر بسرعة وتثبط المرض بكفاءة أكثر من استعمال الجراثيم الكونيدية العادية أو الجراثيم الكلاميدية. كذلك وجد أن ال (FB) من فطريات *T.viride* و *T.harzianum* و *T.hamatum*، تقلل وتثبط بقاء ونمو الفطر الممرض *R.solani*، في التربة وتخفض مرض عفن ثمار الطماطم الناتج عن رايزوكتونيا.

٢- معاملة بذور

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

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

الذرة وفول الصويا بالفطر *T.harzianum*. إن استعمال الفطر الأخير كمعاملة بذور للقطن لمقاومة *R.solani* أعطى نتيجة جيدة في الحقل في إسرائيل.

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

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

٣- الاستعمال على المجموع الخضري

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

من الأمثلة الأكثر نجاحاً في المقاومة الحيوية باستعمال الجنس *Trichoderma* على الاجزاء الخضرية في النبات، هو استعماله للمقاومة الحيوية للأمراض التي تدخل عن طريق الجروح في الأشجار والشجيرات، وذلك عن طريق إضافة الفطر إليها وقت التقليم. لقد ذكر

Grosclaude سنة ١٩٧٠ أن كفاءة الفطر *T.viride* ضد الفطر *Stereum purpureum*، الاسم القديم *Chondrostereum* مسبب مرض الورقة الفضية على البرقوق، تكون عالية عند استعماله وقت التقليم. ولقد ابتكر هذا العالم سنة ١٩٧٣ طريقة لاستعمال الجراثيم الكونيدية للفطر المضاد على الجروح أثناء القطع عن طريق استعمال مقصات خاصة للتقليم. فى إحدى التجارب العملية وجد أن إضافة الكائن المضاد بهذه الطريقة، قبل ٤٨ ساعة من الحقن بالكائن الممرض يحمى شجرة البرقوق ذات عمر سنتين، تماما من المرض، ولكن لا يعطى النتيجة نفسها إذا استعمل الكائن المضاد مع الكائن الممرض فى الوقت نفسه.

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

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

٣٣% لم تعط أية أعراض.

١٧% لم تستجب لهذه المعاملة.

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

لم يقتصر استعمال الجنس *Trichoderma* على الجروح فقط، وإنما استعمله Tronsomo و Dennis سنة ١٩٧٧ لحفظ ثمار الفراولة من مرض عفن المخزن المتسبب عن الفطر

اول التزهير بمعلق مائي من الجراثيم الكونيدية لكل من *T. viride* و *T. polysporum*، وكانت نتيجة المقاومة الحيوية تشبه نتيجة استعمال المبيد الفطري *Dichlofluanid*. كذلك أمكن حفظ ثمار الخوخ ضد مرض البقعة العينية المتسبب عن الفطر *B. cinerea* وذلك برش الجراثيم الكونيدية للفطر *T. pseudokoningii* بعد الحقن الصناعي للازهار بالكائن الممرض وليس عند حدوث المرض من الحقن الطبيعي. إن قلة نجاح المقاومة الحيوية لهذا المرض عند حدوث الإصابة الطبيعية، يكون بسبب درجة الحرارة المنخفضة السائدة وقت الإزهار. وجد أن الفطر المضاد *T. pseudokoningii* غير قادر على النمو على حرارة أقل من 9° م، بينما الفطر الممرض *B. cinerea*، يمكن أن يعيش ويهاجم النبات على حرارة أقل من 9° م. أما بالنسبة للفطر *T. harzianum*، وجد أن رش جراثيمه الكونيدية على أزهار التفاح يخفف الإصابة بمرض البقعة العينية على الثمار، وذلك لأن هذا الفطر يستطيع أن ينمو تحت درجات حرارة منخفضة، كذلك وجد أن مقدرة الفطر *T. harzianum* ضد الفطر *B. cinerea* على العنب في الحقل تعتمد على درجة الحرارة وعلى تركيز اللقاح المستعمل من الجراثيم الكونيدية.

المضادات الحيوية التي يكونها الجنس *Trichoderma*

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

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

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

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

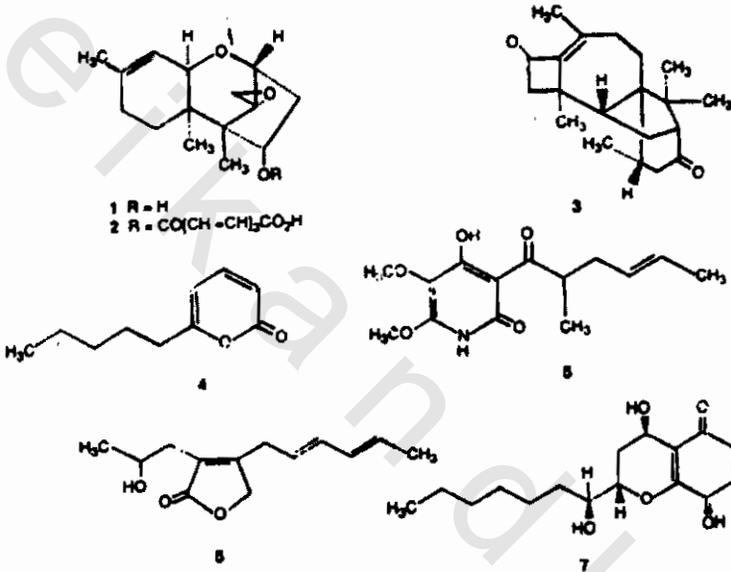
رقم ٤ : *6-pentyl-2-pyrone* : ويفرزه الفطر *T. harzianum* السلالة المعروفة باسم (IMI275950). وجد أن هذا المركب فعال بتركيز ١٠ أجزاء في المليون ضد الفطر *R. solani* والفطر مسبب المرض الماحق في القمح. وهو يعطى مقاومة جيدة دون التأثير على النبات وينطلق ويتخلل التربة، ويمكن أن يعمل كمدخن متوسط الفاعلية.

رقم ٥ : Pyridone harzianopyridone وتفرضه السلالة (IMI 298371) من الفطر *T. harzianum* وهو يؤثر على الفطر *Botrytis cinerea* ويؤثر على *R.solani* بتركيز

١ ملغ/١ مل

٦ - Butenolide ، harzianolide ، ويفرضه *T.harzianum* تحت ظروف معينة .

٧ - Polyketides ويفرضه الفطر *T. harzianum* تحت ظروف معينة .



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

Trichoderma spp.

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

Trichoderma harzianum

ودوره في المقاومة الحيوية

مقدمة

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

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

المجموعة الاولى: Cluster I

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

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

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

المجموعة الثانية Cluster II :

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

المجموعة الثالثة Cluster III :

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

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

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

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

المقاومة الحيوية للجنس *Pythium* بالجنس تريكوديرما

مقدمة:-

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

التفاعل الميسيليومي بين *T.harzianum* و *P.ultimum*

لقد تمت دراسة التفاعل بين هذين الفطرين وذلك كالآتي:-

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

الدراسة بالميكروسكوب الإلكتروني:

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

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



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

a = التفاعل بين الفطريات T حول الفطر P (الاسهم) يلاحظ مظهر التجعد على سطح الخلية.
 b = زيادة اعداد الفجوات.
 المسطرة في a = ٣ ميكرومتر.
 المسطرة في b = ٢ ميكرومتر.

الإجراءات الداخلة في التفاعل بين الفطرين

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

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

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

الثاني : المواد المترسبة يمكن أن تكون قد ترسبت على شكل جزيئات مبنية حديثاً. هذه الاحتمالية تثير سؤالاً هو كيف تستطيع الخلايا الفطرية أن تنظم ترسيب المواد الشبيهة بتركيب الجدار في مناطق غير عادية في الخلية؟؟

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

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

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

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

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



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

P.ultimum

c = انخفاض في كثافة المعلمات على طول قناة اختراق الفطر T.
الأسهم.

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

المسطرة = ٠,٥ ميكروميتر



شكل رقم (١٠) تكملة لشكل رقم ٨،٩

E : تفكك وذوبان المواد الشبيهة بجدار الخلية في منطقة إختراق T .
 الاسهم المزدوجة = تمزق الطبقات الداخلية لجدار الكائن الممرض
 F . اضمحلت خلايا P الى بقايا من الجدر والتي هي معلمة قليلا بمعلق
 Exoglucanase - gold complex
 المسطرة في E = ١ ميكروميتر
 المسطرة في F = ٠,٢٥ ميكروميتر

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

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

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

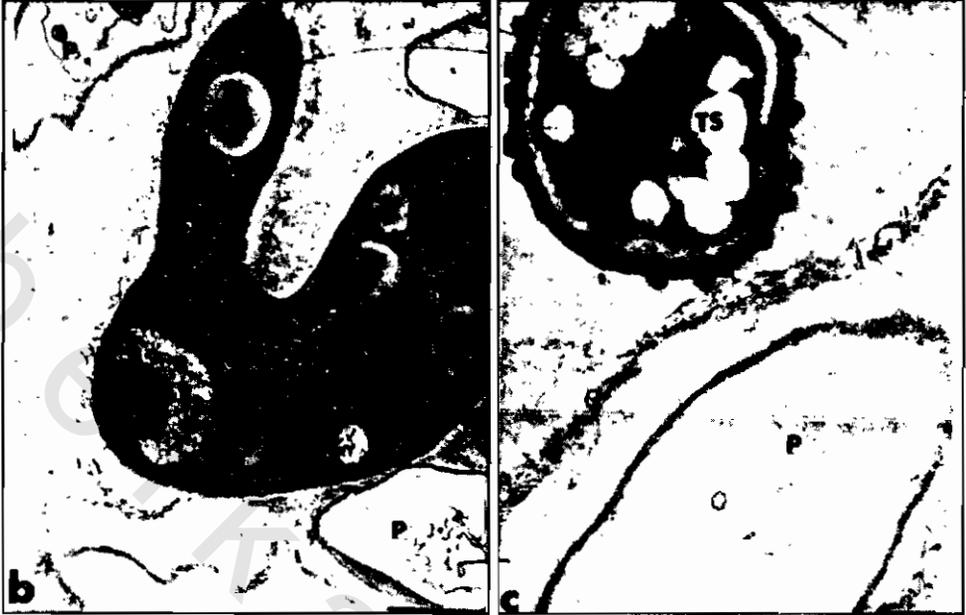


شكل رقم (١١) : صورة بالميكروسكوب الإلكتروني للتفاعل بين *T.harzianum* مع الفطر

Pythium ultimum يشار اليه بحرف P.

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

المسطرة = ٠,٥ ميكرومتر.



شكل رقم (١٢) : تكملة لشكل رقم ١١ .

$c + b =$ تفاعل بعد سبعة أيام من الحقن

B - 1,3 - Glucan لا تتواجد طويلاً في الخلايا المتغيرة لبيئات P.

جراثيم (Ts) الفطر تريكوديرما تبدو على بيئة الآجار.

المسطرة في $c = ٠,٢٥$ ميكروميتر

وفي $b = ٠,٥$ ميكروميتر

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

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

- ١ - إدراك والتصاق الفطر تريكوديرما مع الفطر *Pythium*، حيث إن هذا الأخير يشجع إنبات الجراثيم الكونيدية للفطر الأول.
- ٢ - إنتاج إنزيمات $B - 1,3 - \text{glucanases}$ التي تضعف جدر خلية العائل، وإنتاج كمية قليلة من أنزيم السيلوليز لتسمح باختراق موضعي للكائن المضاد.
- ٣ - إنتاج مضادات حيوية لتفسد نظام الميتابولزم في العائل.
- ٤ - اختراق خلية العائل وإنتاج نشيط لإنزيم السيلوليز يؤدي إلى تحطيم خلية الكائن الممرض.

التفاعل الهيفي بين *T.harzianum*

والفطر *Sclerotinia sclerotiorum*

مقدمة

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

تفاعل الفطرين

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

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

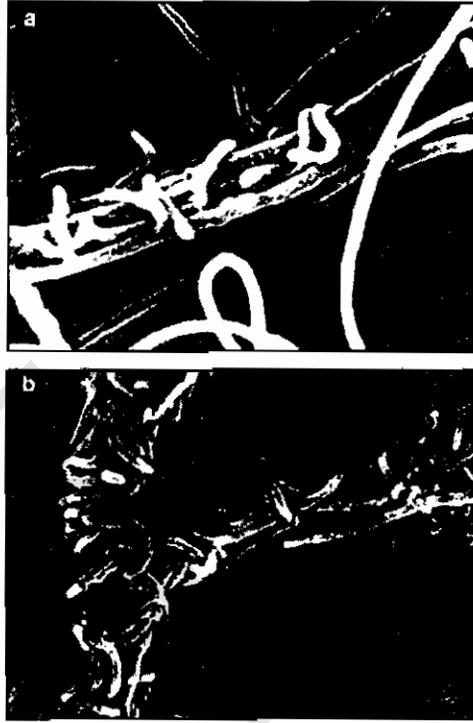
فى التربة المعقمة تنبت الجراثيم الكونيدية للفطر *T.harzianum* (المضاد) وتتكشف إلى ميسيليوم، وتتصل مع هيفات الفطر الممرض *S.sclerotiorum* وتشكل تفرعات قصيرة وأجساماً شبيهة بأعضاء الامتصاص والتي تساعد فى القبض والاختراق لجذر خلية العائل.

هناك نظام قد استعمل فى المعمل لاختبار مقدرة الفطر المضاد فى مقاومة مرض ذبول *Sclerotinia* فى الخيار والخس، حيث كانت تغسل بذور الخيار تحت الماء الجارى ثم يطهر سطحها بمادة $NaOCl$ او فى ٥٪ إيثانول، ثم تغمر بعد ذلك فى معلق الجراثيم الكونيدية بنسبة 5×10^{11} وحدة تكوين مستعمرات / مل من الفطر المضاد *T.harzianum* ثم تترك لتجف هوائياً وتزرع فى بيئة *Peat* مخلوط بنسبة ١٠٠٪ من الفطر الممرض *S.sclerotiorum* ثم توضع فى مرافد الإنبات على حرارة $17^{\circ}C$ لمدة ٢٠ يوماً. أما بالنسبة لتجارب الصويا الزجاجية، فكانت تمزج التربة التى تزرع فيها بادرات الخس، بالجراثيم الكونيدية للفطر المضاد بتركيز 3×10^{11} جرثومة / غرام تربة. كان يستعمل لقاح الفطر الممرض على شكل قطع من الآجار، الذى يحمل أجساماً حجرية منبثة بنسبة ٢ جسم حجرى منبت يدفن على عمق ٣ سم تحت سطح التربة، وعلى بعد ٢ سم من جذور البادرات.

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

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

الفطري على الهيفات، عدا عن التطفل على الأجسام الحجرية، هو المقترح في تفسير الميكانيكية التي بواسطتها يقاوم الفطر المضاد الفطر الممرض تحت هذه الظروف.



شكل رقم ١٣ صورة بالميكروسكوب الإلكتروني للتفاعل الهيفي بين الفطرين *Tharziaium* والفطر *S. sclerotiorum* في المزرعة المزدوجة على بيئة صناعية.
a : هيفاً الفطر تريكوثيرما نامية على طول هيفات الفطر *S. sclerotiorum* ومتفرعة باستمرار وملتفة حولها.
b : المراحل الأخيرة من التطفل. يظهر التفاف الهيفات بكثافة شديدة حول هيفات الفطر الممرض وتتحطم الخلايا.
المقياس ١٠ ميكروميتر.

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

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

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

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

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

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

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

للأضرار في البداية، ولكن الجسم الحجري المستعمر بالفطر يأخذ المظهر المتجدد. إن وجود الفطر *T. hamatum* يبدو أنه ليس له أية تأثير على سلوك تغذية اليرقة. وعلى أية حال فإن تغذية اليرقة في المرحلة الأولى تبدأ في المناطق التي لم يوطد الفطر تريكوديرما نفسه فيها. لقد وجد أن اليرقة لا تستعمل الفطر تريكوديرما غذاء لها أبداً.

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

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

P. fragariae, *P. nicotianae* ، *P.cactorum*

II : الجنس Gliocladium

الفطر *Gliocladium roseum*

مقدمة:

الكائنات الحية الدقيقة المضادة، لها دور كبير في مقاومة كثير من أمراض النبات. لقد أجريت تجارب كثيرة لمقاومة مرض العفن الرمادي Gray mold وأمراض أخرى متسببة عن الكائن الممرض المهلك *Botrytis cinerea* في الفواكه والخضروات والمحاصيل الحقلية، غراس أشجار الغابات ونباتات الزينة ومحاصيل أخرى. إن ظاهرة التضاد الميكروبي ضد الفطر *B.cinerea* من أهم طرق المقاومة الحيوية الملائمة وذات كفاءة عالية في الوقت الحالي، ويمكن أن تكون مترافقة مع طرق المقاومة الأخرى، أو تستعمل لوحدها، وذلك حسب شدة المرض والظروف البيئية، وبالتالي فهي تساعد في عدم الاعتماد على استعمال المبيدات الفطرية الكيماوية. كذلك فإن ظهور سلالات من الفطر *B.cinerea* مقاومة للمبيدات الفطرية وغير ملائمة لمقاومة العائل، تشارك في 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 الذي يبقى في المواد الغذائية، وتؤثر على صحة الإنسان أو الحيوان بالإضافة إلى أضرار البيئة.

إن الفطر الخيطي *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 يلي مقالة طويلة تتعلق بالفطر *G.roseum* وتوضيح الأدوار التي يقوم بها في النظام الطبيعي في المحاصيل ودوره كعامل مقاومة حيوية.

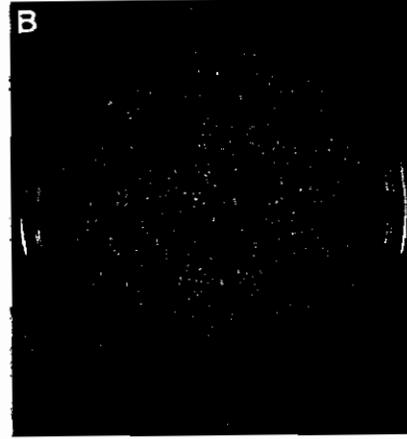
الشكل الخارجي والتصنيف:

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

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

البيئة:

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



شكل (١٤) : الفطر *Gliocladium roseum*.

A : حوامل كونيديية : سوارية فى الأعلى.

خصلية فى الأسفل.

B : نمو الفطر على بيئة PDA.

1 - *Sclerotinia sclerotiorum*

2 - *Phymatotrichum omnivorum*

3 - *R.solani*

4 - *Botrytis* spp.

5 - *Verticillium* spp.

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

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

الفطر يتواجد بكثرة ضمن المجموع الخضري والجذور الميتة والتي فى سن الشيخوخة لكثير من أنواع النباتات، وفى النباتات التى أصبحت ضعيفة عن طريق الظروف غير المناسبة، مثل استعمال مبيدات الحشائش عليها أو المهاجمة من قبل الأمراض.

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

اختيار الفطر *G.roseum* فى المقاومة الحيوية

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

فى حالة اختيار الكائنات الدقيقة المضادة للفطر *B.cinerea*، فإن الباحثين قد أيدوا المنطق القائل بالتكيف البيئى للميكروب مع العائل النباتى، حيث إن هذا يكون مفيداً للحصول على مقاومة حيوية مفيدة وفعالة لمدة طويلة فى نظام المحاصيل، وبناء على ذلك تستعمل نباتات العائل كمصدر رئيسى للكائنات المختبرة. تشمل طرق الاختيار الفطريات

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

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

المقاومة الحيوية للفطر *B.cinerea*

١- على الفراولة:

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

تثبط باستمرار الفطر الممرض المذكور بنسبة حوالى ٩٨٪ أو أكثر، وذلك فى الاختبارات التى أجريت على الاوراق المتصلة وغير المتصلة بالنبات والبتلات والأسدية. وكذلك وجد أن هذا الكائن المضاد، يؤدى دوره بثبات واستمرارية بطريقة أفضل من كائنات حية دقيقة أخرى مثل *Myrothecium verrucaria*، *Alternaria alternata*، *Trichoderma viride* و *Penicillium spp.* والمبيد الفطرى القياسى كبتان. تكون الانسجة التى تستعمل فى الاختبار عادة محقونة بالكائن الحى الدقيق المضاد بنسبة ١٠٪ جرثومة كونيديا/ مل ماء، بالإضافة لمادة مطهرة سطحية للفطريات، ثم يضاف لهذه الانسجة بعد ٢٤ ساعة الفطر الممرض *B.cinerea* بتركيز ١٠٪ جرثومة كونيديا/ مل ثم بعد ذلك تحصن على *PCA* ثم تقييم مقدرة التجزئ فى الكائن الممرض.

وعلى أية حال، فإن أفضل طريقة للتقييم، كانت تجرى فى قطع من الحقل مزروع فيها نباتات الفراولة على خطوط. كانت تستعمل الفطريات المختبرة بنسبة ١٠٪ جرثومة كونيديا/ مل، أو المبيد الفطرى كبتان، أسبوعيا لوقاية الأزهار، الطريق الرئيسى لاختراق الثمار بواسطة الفطر الممرض *B.cinerea* فى الفراولة. كانت تجرى التجارب بسرعة قبل حلول الليل ونزول الندى، معتمدة فى ذلك على أن الندى والظلام يمكن ان يسهلا بقاء وفعالية عامل المقاومة الحيوية.

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

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

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

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

٢- صوت العليق Raspberry

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

الأزهار والثمار بالكائن المضاد، وذلك بسبب أن الفطر الممرض قادر على أن يهاجم الثميرات الصغيرة مباشرة، بالإضافة الى ذلك، عن طريق الاختراق خلال أنسجة الزهرة. عند معاملة العناقيد الزهرية في أصناف العليق التي تثمر صيفاً، بالفطر الممرض بمعدل 5×10^2 جرثومة كونيدية/ مل (معاملة كنترول) او مع أى من الكائنات المضادة *G.roseum*، *T. vi-*، *Trichothecium roseum*، *ride* جميعها بتركيز 10^6 جرثومة كونيدية/ مل ماء. كانت تقدر شدة المرض بعد كل مرة تجمع فيها الأزهار أو الثمار حيث كانت تحضن في رطوبة عالية على $20 - 22^\circ$ م لمدة عشرة أيام. دلت النتائج على ان الكائنات المضادة والمبيد الفطري كابتان تثبط الفطر الممرض *B.cinerea* في الأزهار والثمار غير الناضجة بنسبة $57 - 73\%$ و $37 - 61\%$ بالترتيب. أما في التجارب التي أجريت على الثمار التي تحمل في الصيف والخريف فإن الفطر المضاد *G.roseum* يثبط عفن الثمرة بحوالي $27 - 54\%$ عندما يستعمل مرة واحدة على عناقيد الأزهار وبحوالي $48 - 61\%$ عندما كان يستعمل عندما تكون العناقيد الزهرية عند بداية التزهير ومرة ثانية عند تكشف الثمار، أما بالنسبة لتأثير الكبتان فكان $18 - 25\%$ و $23 - 40\%$. إما تحت ظروف تأخير أو إطالة فترة التزهير والإثمار، تكون هناك ضرورة لتكرار المعاملة اكثر من مرتين للحصول على أفضل مقاومة لمرض عفن الثمار في العليق. كذلك وجد أن الفطر *G.roseum*. له أيضا قوة مضادة للفطر *B.cinerea* في الأوراق والقصبات في العليق (شكل ١٥).

٢- غراس الصنوبر والبيسيه

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

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

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

عند معاملة غراس البيسيه السوداء بالفطر *G.roseum* بتركيز $10^5 \times 10^7$ جرثومة كونيديية/مل وحفظها تحت رطوبة نسبة عالية لمدة ٢٤ ساعة، ثم بعد ذلك حقنت بالكائن الممرض *B.cinerea* بتركيز $10^5 \times 10^7$ جرثومة كونيديية لكل مل، ثم أعيدت تحت الرطوبة نفسها، لمدة ٢٤ ساعة وحرارة ٢٠ - ٢١ م ثم بعد ذلك نقلت الى مرافد الانبات Growth chamber ثم فحصت كل ٢ - ٤ أيام لمعرفة كفاءة تجرثم الكائن الممرض ومحتواها من الكلوروفيل ومعدل اجراء عملية التمثيل الضوئى . وجد أنه بعد ٦ - ١٥ يوماً فإن الفطر الممرض تجرثم فى ٥٦ - ٦٣٪ من الأوراق الابرية ، وأنتج (٢٩,٣ الى ٤٠,٥) $10^7 \times 10^8$ جرثومة كونيديية لكل ورقة إبرية فى النباتات التى عوملت بالكائن الممرض فقط (الكنترول)، بينما النباتات التى عوملت بالكائن المضاد قبل حقنها بالكائن الممرض، فإن حدوث التجرثم للكائن المضاد كان ١ - ٨٪ وإنتاج الجراثيم (٠,٥ - ٦,٦) $10^7 \times 10^8$ جرثومة كونيديية لكل ورقة إبرية وإن الكائن الممرض لم يتجرثم فى البادرات المعاملة بالكائن المضاد والماء (شكل رقم ١٦) .

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

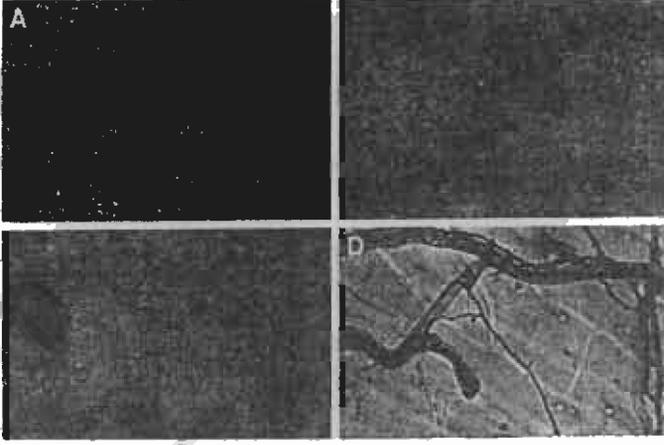
(الضوئي) في النباتات المصابة بالفطر الممرض، ولكن ليس له تأثير على هذه الصفات عندما لا يكون الكائن الممرض موجوداً.

أما في غراس الصنوبر الاحمر وجد أيضاً أن الفطر *G.roseum* يعطى نتائج جيدة عند استعماله بتركيز ١٠^٨ جرثومة كونيديية / مل فإنها تثبط الفطر الممرض *B.cinerea* بحوالي ٨٨٪ في غراس ذات عمر سنة واحدة، والمحقونة بالكائن الممرض بتركيز ١٠^٦ جرثومة كونيديية لكل مل. كان الكائن المضاد أيضاً قوياً في معالجة العفن الرمادي في الغراس ذات عمر سنتين وثلاثة سنوات النامية في وجود اللقاح الطبيعي من *B.cinerea* في الصوبات الزجاجية والمشاتل خارج الصوبا الزجاجية.

خضار ونباتات زينة في الصوبا الزجاجية

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

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



- شكل رقم ١٥ تكشف تفاعل *G.roseum* مع الكائن الممرض *B.cinerea* في العليق.
- A : حوامل كونيديية سوارية وعلى شكل الخصلة للفطر المضاد *G.roseum* على نسيج الورقة الحية.
- B : إنبات الجرثومة الكونيديية، وتكوين عضو التصاق للفطر *B.cinerea* في الورقة في غياب *G.roseum*.
- C : عدم إنبات الجرثومة الكونيديية للفطر *B.cinerea* على الورقة في وجود هيفات الفطر المضاد.
- D : هيفات ضيقة من الفطر المضاد تلتف حول وتخترق هيفا سميكة من الفطر الممرض.
- G : أعراض مرض العفن الرمادي المتسبب عن *B.cinerea* على ثمار العليق.



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

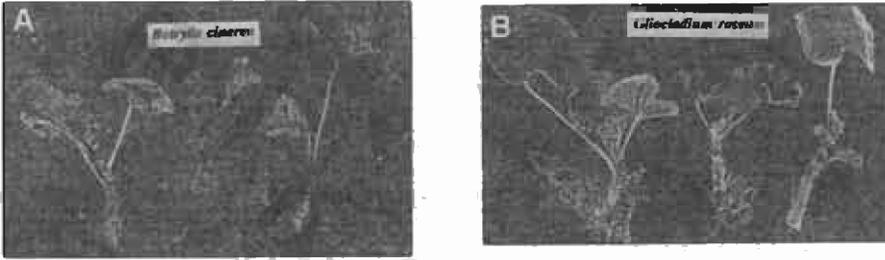
كانت هناك عزلات من *Trichoderma sp.* من بين العزلات ذات الأداء المتميز المشابه لأداء *G.roseum* فى بعض العوائل. من بين هذه العزلات *T.koningii* فى نبات البيجونيا وأخرى فى نبات بخور مريم وثلاثة عزلات من *T.harzianum* فى الجيرانيوم. من بين عزلات الجنس *Stilbella* (هذا الجنس لم يذكر فى أى من الأبحاث على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

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

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

غالباً ما يستعمر الفطر *B.cinerea* بتلات ازهار الطماطم المتدلية كغذاء أساسي، والتي منها يخترق ثمار الطماطم الناضجة أو الخضراء إما مباشرة او عن طريق مهاجمة اوراق الكأس الملتصقة بالثمرة اولا ثم يدخل الى الثمرة. عندما تحقن البتلات بالكائن الممرض بتركيز 10×10^5 جرثومة كونيدية/مل ثم تنبت هذه الجراثيم وتكون هيفات فإنها تتوجه

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



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

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

B: عقل محقونة بالفطر الممرض + الفطر المضاد.

جروح النبات

تعتبر جروح النبات مسرّحاً آخر تلعب فيه عوامل المقاومة الحيوية دوراً فعالاً، وخاصة الفطر *G.roseum*. هذا الكائن المضاد يوقف بشدة الكائن الممرض *B.cinerea* في عقل ونباتات الأم في نبات الجيرانيوم (بعد فصل العقل عن النبات الأم وإحداث جروح فيه)، وفي جروح سيقان الطماطم عند إزالة الأوراق السفلية، وفي جروح ضربة الشمس على أوراق *Exacum affine* (١٩). في حالة نبات الجيرانيوم، فإن غمر العقل الحديثة التي فيها جروح ناتجة عن النهش أو إزالة الأوراق، في المعلق الجرثومي للفطر *G.roseum* بتركيز ١٠% جرثومة كونيديية / مل، يقاوم العفن الرمادي كلية تقريباً، هذه الكفاءة تشابه أو أحسن من التي يحدثها المبيد Iprodione. العقل المعاملة بالفطر *G.rosom*، يتكشف منها جذور سليمة.

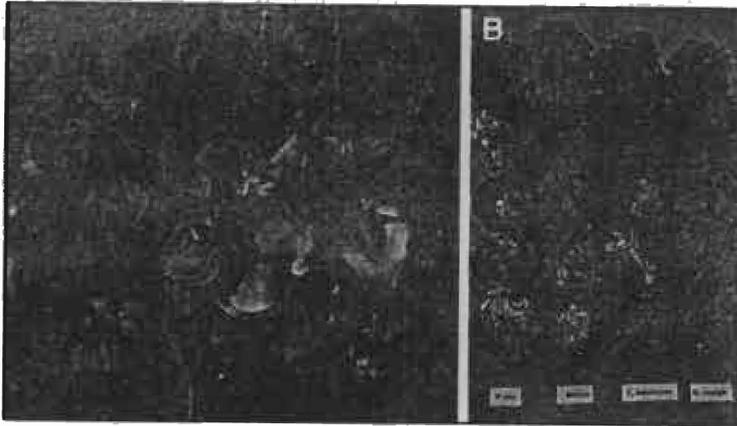


شكل رقم (١٨) وقاية الكأس والثمار في الطماطم ضد الفطر *B.cinerea* في بتلات طماطم مستعمرة من قبل الفطر المضاد، عن طريق معاملة البتلات بالفطر *G.roseum*.
 A: كأس مصابة باللفحة ناشئة عن بتلات مريضة
 B: عفن الثمار متكشف من كأس مريضة
 C: كأس سليمة محفوظة بواسطة الفطر *G.roseum* المستعمل على البتلات.
 D: ثمار سليمة محفوظة بواسطة الفطر *G.roseum* ملتصقا مع البتلات.

بغزارة وتكون أكثر قوة من تلك التي عوملت بالمبيدات الفطرية، وبالمقابل فإن العقل التي حقنت بالفطر *B.cinerea* تتكشف عليها بقع كبيرة ويموت أكثر من ربعها بسرعة. أما في الطماطم فإن استعمال الفطر *G.roseum* بتركيز 10^6 جرثومة كونيديية/ مل مضافاً إلى الجروح الناتجة من إزالة الأوراق، يحفظ الساق لعدة شهور بعد الاستعمال. أمكن إعادة عزل الفطر *B.cinerea* من ٧٠٪ من مناطق الجروح التي حدثت، بعد إزالة الأوراق عندما حقنت هذه لجروح الحديثة بالكائن الممرض (بتركيز $10^5 \times 10^6$ جرثومة كونيديية/ مل) فقط،

ولكن من أقل من ٢٪ من الجروح التي عوملت بالفطر *G.roseum* قبل الحقن بالكائن الممرض بمدة ٢٤ ساعة.

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



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

A : جروح متكونة من ضربة الشمس على الاوراق

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

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

العوامل المؤثرة على كفاءة *G. roseum*

١- طور نمو أعضاء العائل:

المرحلة التي تمر بها الأوراق ابتداءً من أول امتدادها في المراحل الأولى من النمو، حتى الوصول إلى طور الشيخوخة، بشكل عام، تكون ذات تأثير بسيط على فعالية الفطر *G.roseum* ضد الفطر الممرض *B. cinerea*، في المجموع الخضري لكل من الفراولة، البيجونيا ونبات بخور مريم. الأوراق التي بدأت في الامتداد والتوسع في البيجونيا وبخور مريم، تكون أقل قابلية لاستقبال الفطر الممرض والتي تقاوم فيها الإصابة (إذا حدثت) حيويًا بصعوبة أو يصعب قياس نجاح المقاومة الحيوية فيها. في العوائل الثلاثة المذكورة كانت كفاءة المقاومة الحيوية ٣٠ - ٧٠٪ أقل في الأوراق في سن الشيخوخة، بالمقارنة مع الأوراق التي في مرحلة قبل الشيخوخة، وتكون صفراء تمامًا في الأوراق الميتة.

المقاومة الحيوية للفطر *B.cinerea* في الأزهار تمثل تحديًا خاصًا بسبب تعقيد نمو، تكشف وتركيب الأزهار. وبشكل عام فإن الأعضاء المختلفة في الأزهار المتكشفة والتي في مرحلة الشيخوخة لمدة مختلفة من الزمن تكون مختلفة القابلية للإصابة بالفطر *B.cinerea*، وذات تفاعلات مختلفة بالكائنات الميكروبية المضادة. عند دراسة تأثير عمر الزهرة على المقاومة الحيوية للفطر *B.cinerea*، وجد في دراسات على الأزهار المتفتحة جزئيًا، كاملة التفتح والأزهار في طور الشيخوخة لنبات البيجونيا التي قد حققت بالكائن الممرض (٦١٠ جرثومة كونيديا/مل) ثم الحقن بالكائن المضاد بعد ٢٤ ساعة (إما بالفطر *G.roseum* أو الفطر *T.koningii* بتركيز ١٠ جرثومة كونيديا/مل) وجد أن هذه التركيزات من الكائن المضاد لا تؤثر على القابلية للإصابة بالفطر الممرض في الأطوار المتتابعة لتكشف الزهرة. وجد أن الفطر *G.roseum* يثبط الكائن الممرض بحوالي صفر في الأزهار المتفتحة جزئيًا، ٤٩٪ في الأزهار كاملة التفتح، ٦٨٪ في الأزهار التي في طور الشيخوخة، بينما *T.koningii* كانت مقدرته على التثبيط بحوالي ٩٣ - ٩٥٪ في المراحل الثلاثة.

٢- تركيز اللقاح

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

الدراسات التي أجريت تحت ظروف متحكم بها، زدتنا بصورة منظورة لمتطلبات اللقاح من الفطر المضاد لمقاومة الفطر الممرض في عديد من المحاصيل. عند حقن المجموع الخضري والأزهار في البيجونيا ونبات بخور مريم بتركيزات مختلفة من الفطر الممرض (من صفر الى ^{٦١٠} جرثومة كونيديية/مل) ومن الفطر المضاد بتركيزات (من صفر الى ^{١٠} جرثومة كونيديية/ مل)، في جميع الاتحادات تم الحصول على مقاومة حيوية جيدة، اساسا عندما كان تركيز الكائن المضاد مشابهاً أو أكثر من ذلك التركيز في الكائن الممرض. في دراسة مماثلة على العليق، فإن المستويات العالية من المقاومة (٩٠-١٠٠٪) قد تم الحصول عليها في الأوراق لجميع الاتحادات من ^{٢١٠} الى ^{٦١٠} جرثومة كونيديية من الفطر الممرض/ مل و ^{١٠} الى ^{١٠} جرثومة كونيديية/ مل من الفطر المضاد، أما في السيقان، الأسيدي والمياسم، فقط عندما يكون تركيز الكائن المضاد ١٠ أو ١٠٠ ضعف أكثر من ذلك الذى للكائن الممرض. ومن غير المتوقع فإن الفطر المضاد على تركيز ^{١٠} جرثومة كونيديية/ مل غالباً ما تكون أقل فعالية من تركيز ^{٢١٠} أو ^{١٠} جرثومة كونيديية فى الاسدية والمياسم، لوحظت أيضاً حالة واحدة فى المجموع الخضري لشتلات البيسيه السوداء فى غرف الانبات. يبدو واضحاً أنه ليس من المهم زيادة التركيزات المثلى للفطر المضاد للمقاومة الحيوية فى المحاصيل، خاصة عندما تكون الظروف ملائمة لبقاء الكائن المضاد. فى

الصوبات الزجاجية وغرف الإنبات، فإن استعمال تركيز 10^7 جرثومة كونيدية/مل من الفطر المضاد يثبط بشدة الفطر الممرض بتركيز 10^6 جرثومة كونيدية/مل فى مختلف أعضاء نبات البيجونيا، بخور مريم، *Exacum*، جيرانيم، الجيريارا، 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 10^6 الى 10^8 جرثومة كونيدية/مل من الفطر المضاد عادة، يعطى مقاومة جيدة للفطر الممرض فى المحاصيل فى الحقل وفى الصوبا الزجاجية. اللقاح المحتوى 10^6 جرثومة كونيدية/مل من الفطر المضاد عادة ما يكون كافياً فى الفراولة، البيجونيا، وبخور مريم. أما تركيز 10^7 جرثومة كونيدية/مل من الفطر المضاد يعطى نتائج أفضل فى العليق، أما تركيز $10^6 - 10^8$ كان أقرب للوضع الأمثل للمقاومة الحيوية فى البيسيه السوداء.

فى تجارب أخرى وجد أن استعمال الفطر *G.roseum* بتركيز 5×10^6 جرثومة كونيدية/مل تثبط مرض لفحة الأوراق المتسبب عن الفطر *B.squamosa* على البصل فى الحقل بنسبة 50 - 58%.

٣- الحرارة

أجريت دراسات على الحرارة وعلاقتها مع فعالية المقاومة الحيوية التى يقوم بها الفطر *G.roseum* ضد الفطر الممرض *B.cinerea* فى خمسة عوائل. بشكل عام فان مستوى المقاومة الحيوية يكون عالياً على $20 - 25$ م°، وأيضاً على 30 م° فى العوائل التى فيها يمكن الحصول على قياس للاصابة، ولكنها كانت تدريجياً أقل على 15 و 10 م°. درجات الحرارة المنخفضة تقلل المقاومة الحيوية بشكل هامشى (الحد الأدنى) فى الاوراق فى نباتات الفراولة والبيجونيا وفى أسدية نبات العليق، ولكنها تقلل كفاءة المقاومة الحيوية بشكل متوسط فى اوراق العليق، بخور مريم والجيرانيوم وفى بتلات البيجونيا، ولكن بشكل عال وواضح فى بتلات بخور مريم والجيرانيوم. التأثيرات المختلفة لدرجة الحرارة على المقاومة الحيوية فى الاعضاء المختلفة فى العائل كانت واضحة فى أربعة عوائل. ومن الدراسات المستفيضة على

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

٤- الرطوبة الحرة

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

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

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

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

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

طرق عمل الفطر *G.roseum*

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

ومن الجدير بالذكر أن بعض الدراسات أثبتت أن التفاعلات بين *G.roseum* والفطر *B.cinerea* تكون ظاهرة بوضوح على أوراق، أسدية ومياسم أزهار نبات العليق الموجودة تحت الرطوبة العالية المستمرة، على الأوراق فإن الفطر المضاد يثبط بقوة إنبات ونمو أنبوية الانبات للفطر *B.cinerea*، ولكن نادراً ما يتطفل على الكائن الممرض. وعلى أية حال فإنه على السيقان، فإن الجراثيم الكونيدية للفطر الممرض كثيراً ما تنمو وتنتج أنابيب إنبات جيدة التكوين وهيفات سطحية بغض النظر عن قربها من الجراثيم الكونيدية، أنابيب الانبات او هيفات الفطر المضاد. يكون التضاد واضحاً على السيقان على شكل تثبيط معتدل لنمو أنبوية الانبات وتطفل قوى على الفطر الممرض بواسطة الفطر المضاد. خلال توفر الرطوبة العالية (٣٢-٧٢ ساعة) فإن تفرعات هيفية قصيرة من الفطر المضاد تتصل مع، تنمو على أو تلتف حول (وفي كثير من الحالات تخترق الجراثيم الكونيدية) هيفات الفطر *B.cinerea*. عادة فإن الخلايا المهاجمة تفقد محتوياتها، وتنهار بعض الهيفات، سواء كانت أم لم تكن خلايا الفطر الممرض حية عند اختراقها. الهيفات النامية داخليا أو خارجيا او السطحية او التي بين الخلايا، تدل على أن كثيرا من الهيفات تكون متداخلة مع بعضها البعض من كل من الفطرين الممرض والمضاد وذلك عند مقارنة النمو المتكرر الرقيق للهيفا في الكائن الممرض المتكشفة ضمن الخلايا المتحطمة من النقوب التي في الحواجز للخلايا غير المتحطمة المتجاورة. وبشكل عام فإنه على سطوح الأسدية فإن الفطر المضاد لا يثبط إنبات،

نمو أو إنتاج أعضاء الالتصاق appressoria ووسادة العدوى للفطر الممرض، ولم يلاحظ أنها تتطفل على الكائن الممرض. وعلى أية حال فإن الكائن المضاد يخفف كثيراً من حدوث الاستعمار في الأسدية بواسطة الكائن الممرض. لقد اعتمد على الاختلافات في توافر وتركيب المواد الغذائية والمواد المضادة الفطرية في الإفرازات على سطح العائل، قد اعتمد عليها، كمنظريه لتوضيح الاختلافات غير العادية في تفاعلات الكائن المضاد مع الكائن الممرض على الأنسجة المختلفة لنبات العليق.

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

هناك أنواع أخرى من الفطر *Gliocladium* تنتج مضادات حيوية مختلفة لها دور في المقاومة الحيوية (شكل ٢٠) هذه المضادات هي:

١ - Viridin يفرزه الفطر *Gliocladium virens*

٢ - Gliotoxin يفرزه الفطر *G.deliquescens*

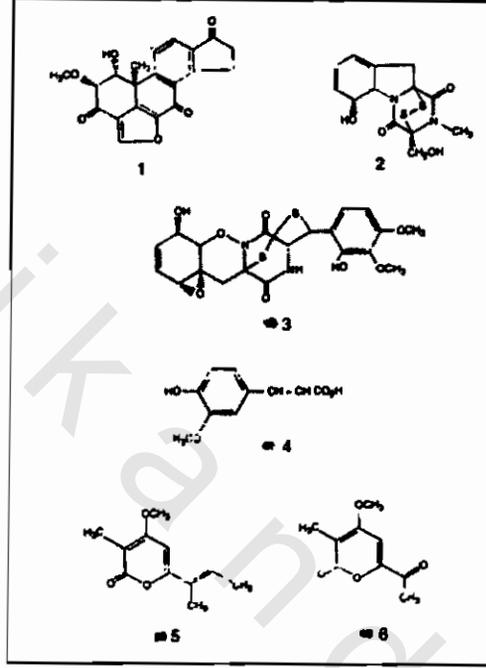
٣ - Gliovirin يفرزه الفطر *G.deliquescens*

٤ - Ferulic acid يفرزه الفطر السابق أيضاً.

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

٦ - Pyrones, nectriapyrone يفرزه الفطر *G. vermoesonii*.

٧ - Nectriapyrone + vermopyrone يفرزه الفطر السابق أيضاً.



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

١ - viridin

٢ - Gliotoxin

٣ - Gliovirin

٤ - Ferulic acid

٥ - dehydrogliotoxin

٦ - nectriapyrone

طرق استعمال الكائن المضاد *G.roseum* عمليا

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

الفطر الممرض *B.cinerea* على كثير من المحاصيل. يمكن الحصول على لقاح الفطر المضاد *G.roseum* بسهولة وقلة تكاليف، وذلك بتنمية الفطر على حبوب القمح أو النجيليات الأخرى. فى بعض المعامل يمكن الحصول على تركيزات عالية من الكائن المضاد (١ - ٥ x ١٠^٩ جرثومة كونيدية / غم) خلال ٣٥ يوماً على حبوب القمح المحفوظة على ٢٠ - ٢٣ °م. بعد فترة النمو الابتدائى للميسيليوم الأولى (١٤ - ١٨ يوماً) تترك المزارع لتجف ببطء، هذه العملية تشجع إنتاج الحوامل الكونيدية التى هى على شكل خصل والتى تنتج محصولاً وفيراً من الجراثيم الكونيدية أكثر من إنتاج الحوامل الكونيدية ذات الشكل السوارى، حيث أن الحوامل الكونيدية السوارية تتكون عادة تحت ظروف الرطوبة العالية. بالإضافة الى الجراثيم الكونيدية فإن أجزاء الميسيليوم من الفطر *G.roseum* يمكن عزلها من حبوب القمح بعد ١٥ يوماً، حيث وجد أنها فعالة ضد الفطر الممرض *B.cinerea* فى الفراولة. الكونيديات المأخوذة من حبوب القمح يمكن تخزينها لمدة أكثر من سنة على حرارة ٣ - ٥ °م، ولمدة ٣ شهور على حرارة ٢٠ - ٢٣ °م دون أى فقد معنوى فى حيوية او كفاءة المقاومة الحيوية التى تحدثها، هذه المعلومات مهمة فى الإنتاج التجارى للكائن المضاد. قبل استعمال الكائن المضاد على المحاصيل، فإن الجراثيم الكونيدية لهذا الفطر يمكن أن تعلق فى ماء 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 *G.roseum* تعتمد على نوع نسيج العائل الذى يتطلب الوقاية، فمثلاً طريقة الرش تستعمل لإسقاط وترسيب القطيرات الصغيرة من اللقاح بانتظام على السطح المستهدف. هذه الطريقة مناسبة بشكل عام فى معاملة المجموع الخضرى والأزهار فى كثير من المحاصيل. هناك طرق أخرى أكثر تخصصاً وحدائث تكتشف باستمرار للاستعمال على الانسجة المستهدفة الخاصة. بالنسبة للجروح التى تحدث على عقل الجيرانيوم، تعامل بسهولة عن طريق الغمر السريع للعقل فى اللقاح، بينما الجروح الناتجة عن إزالة الأوراق فى الطماطم والخيار فى الصوبات الزجاجية، يمكن أن تعامل باستعمال الرشاشة اليدوية أو الفرشاة أو قطعة قماش ماسحة. الوسائل التى تستعمل باستمرار لإزالة الأوراق السفلية، يمكن أن تستعمل لرش اللقاح على الجروح وتشارك فى فعالية هذه الطريقة. أزهار الفراولة والعليق يتم معاملتها بنجاح بالفطر المضاد *G.roseum* باستعمال النحل كعامل لنقل اللقاح.

دور نحل العسل في المقاومة الحيوية

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

تتم عملية استعمال النحل، وذلك عن طريق تشكيل مسحوق من جراثيم الفطر المضاد. يوضع هذا المسحوق في معلق مائى سميك ويلق هذا المعلق فى خلية النحل أمام مدخلها. المواد التي يخلط بها هذا التركيب المحتوى على الجراثيم، لكي تستعمل من قبل نحل العسل أو النحل الطنان تتكون من تشكيلات مختلفة من المواد الغذائية شبه الجافة، مخلوطة مع بودرة التلك مع نخالة الذرة. كما سبق وذكرنا يعلق المعلق فى طريق النحلة لكي تلامسه أثناء خروجها من الخلية حيث يتلوث جسمها بهذه المواد التي تحمل جراثيم الفطر. عند إجراء اختبارات على النحل الذى يخرج من الخلية ويمر على هذا التركيب الذى يحوى 10×5 الى 10×1 وحدة تكوين مستعمرات من الفطر المضاد *G.roseum* / غرام، وجد أن كل نحلة تحمل مئات الألوف من الوحدات مكونة المستعمرات من الكائن المضاد. تستطيع كل نحلة أن تعطي ٣٠٠-٢٧٠٠٠ وحدة تكوين مستعمرات لكل زهرة فى الفراولة، و ٦٠٠ - ٢١٠٠ وحدة تكوين مستعمرات لكل زهرة فى العليق، بينما فى النحل الطنان، تستطيع كل نحلة أن تنقل ٤٥٠-٢٤٠٠ وحدة تكوين مستعمرات لكل زهرة فى العليق. إن كمية اللقاح التي تحملها نحلة العسل أو النحلة من النوع الطنان تكون لقاحاً كافياً للمقاومة الحيوية للفطر الممرض *B.cinerea* فى بنلات الازهار والاسدية فى أزهار الفراولة وأزهار العليق، بينما ثمار العليق من الصعوبة بمكان، أن تكون كمية الجراثيم الواصلة اليها كافية للمقاومة الحيوية للفطر الممرض، وذلك بسبب أن النحل لا يزور هذه الثمار كثيراً حتى يضع عليها جراثيم الفطر المضاد *G.roseum*، عدا عن ذلك فإن الكائن الممرض يمكن أن يخترق الثمار الصغيرة مباشرة بالإضافة لمقدرته على اختراق بعض الازهار.

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

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

إن فعالية استعمال النحل، في نقل جراثيم الفطر المضاد على بتلات الأزهار، بشكل عام يثبط وجود الفطر الممرض *B.cinerea* على البتلات والأسيديّة والثمار بكفاءة تشبه استعمال اللقاح رشاً. في بعض الحالات تكون هذه الكفاءة أفضل من استعمال طريقة الرش، وذلك لأن الجراثيم المستعملة في طريقة الرش يتسرب نسبة كبيرة منها مع المحلول، أما باستعمال النحل فإن نسبة الجراثيم تبقى مركزة في الزهرة، وتزداد باستمرار كلما زادت مرات زيارة النحلة للزهرة يومياً. إذا كانت الظروف ملائمة فإن النحلة تضع (٦،٣ - ٣٢) $\times 10^4$ وحدة تكوين مستعمرات من الفطر المضاد على الزهرة يومياً، وإذا كان مصدر اللقاح يحوي جراثيم بتركيز عال (5×10^8) وحدة تكوين مستعمرات فإن النحلة يمكن أن تضع (٩ - ١٨٠) $\times 10^4$ وحدة تكوين مستعمرات من الفطر المضاد على الزهرة يومياً.

الفطر *Gliocladium virens*

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

1 - *Phytophthora cinnamomi*.

2 - *P. cactorum*

3 - *P.fragariae*

4 - *P.nicotianae*

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



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

III: الجنس *Cladorrhinum*

مقدمة:

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

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

تنمو مستعمرات هذا الفطر وتنتشر بالعرض وذات خصل شعرية ولها ميسيليوم هوائي وتكون ذات لون رمادي إلى أرجواني مصفرة ذهبية، والتي أحيانا تشكل عناقيد من الهيفات الخضرية الشفافة. الجراثيم الكونيدية غير واضحة، وتأخذ الشكل الإصبعي أو الكروي، وذات حجم $(3-3.5) \times (2.5-3)$ ميكرومتر. يمكن أن يعزل الفطر من التربة او من Buck-wheat وقد وصف الفطر بأنه من ساكنات التربة، إلا أنه من الصعوبة عزله من التربة نظراً لصعوبة إنبات الجراثيم الكونيدية على البيئات الغذائية المتوفرة.

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

تأثير الفطر *Cladorrhinum* على نمو الفطر رايزوكتونيا

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

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

جدول رقم ٣٤ : البقاء والنمو الترممي للفطر *R.solani* العزلة (R - 23) في تربة LS و SCL مع تحضيرات الفطر المضاد على النخالة بأعمار مختلفة من السلالة CF-١.

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

ملاحظات على الجدول:

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

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

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

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

ملاحظات على الجدول :

كان يتم التقدير بعد ٣ أسابيع من إضافة تحضيرات النخالة ١٪ وزن/ وزن إلى التربة الملوثة بالكائن الممرض . دليل الاستعمار كما فى الجدول السابق .

جدول (٣٦) : النباتات السليمة من الباذنجان والفلفل المزروعة في مخلوط (بدون تربة زراعية) ، ملوثة بالفطر الممرض *R.solani* ، العزلة R- 23 ، المعاملة بمعدلات عديدة من تحضيرات ذات عمر ١٠ أيام من العزلات المختلفة من الفطر المضاد بعد ٢ و ٤ أسابيع من النمو.

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

ملاحظات على الجدول :

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

IV الجنس *Talaromyces*

دور الجنس في المقاومة الحيوية

يعتبر الفطر *T.flavus* من الفطريات الإسكية ساكنات التربة، الطور اللاجنسي له يسمى *Penicillium dangeardii* وله اسم مرادف هو *P.vermiculatum*. يستعمل هذا الفطر في المقاومة الحيوية لبعض امراض النبات، فهو يتبطن ذبول الفير تسليم في الطماطم، الباذنجان والبطاطس، ويتطفل على كل *Sclerotium Sclerotinia*, *R.solani*, *Sclerotium rolf-* من *sii*. وبشكل عام فان الميكانيكية المستعملة من قبل هذا الكائن المضاد في المقاومة الحيوية ضد الفطريات الممرضة النباتية، تشمل انتطفل الفطرى Mycoparasitism، التضاد الحيوى، التنافس والمقاومة المستحثة.

يستعمل هذا الفطر الأنزيمات المحللة لجدار الخلية مثل - gluca- 1.3 - B- Chitinase, nase, cellulase, وجد أن الفطر *T.flavus* يضاد الفطر *Verticillium dahliae* عن طريق التطفل والتضاد الحيوى، ووجد أيضاً أن الأجسام الحجرية الدقيقة -Mi- *crossclerotia* للفطر الممرض *V.dahliae*، يمكن أن تقتل براشح مزرعة الفطر المضاد *T.flavus*. هذه السمية التي يظهرها راشح المزرعة يمكن أن تعزى الى فعل مادة Glucose oxidase. مع أن الفطر *T.flavus* ينتج عديداً من الإنزيمات المفرزة خارج الخلايا، إلا أنه لغاية ١٩٩٧ لم يحدد أى من هذه الانزيمات له الدور الأهم الذى يلعبه في المقاومة الحيوية.

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

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

الحيوية به ضد الفطر الممرض *S.rolfsii*، تتعلق بنشاطه لإفراز إنزيم Chitinase. ومن ناحية أخرى فإن نشاط *T.flavus* فى المقاومة الحيوية للفطر *V.dahliae* يعتمد على نشاط مركبات التضاد الفطرى مثل Glucose - oxidase حيث إن هذه المادة تعوق إنبات ونمو هيفات الفطر، وتسبب اللون الأسود فى الأجسام الحجرية الدقيقة *Microsclerotia* المتكونة حديثا. الجدول (رقم ٣٧) يبين كفاءة بعض السلالات فى إنتاج الإنزيمات المختلفة.

أما بالنسبة للمقاومة الحيوية لمرض عفن ساق الفاصوليا المتسبب عن الفطر *S.rolfsii*، فتبين أن عزلات الفطر *T.flavus* قادرة على تخفيض المرض بنسبة ٦٤٪، وذلك عند معاملة الأجسام الحجرية بالجراثيم الكونيدية من السلالة المقاومة للمبيد بنليت TFI-R6، بينما لم تخفض السلالة TF- 62 و TF- 46 الإصابة بالمرض (جدول رقم ٣٧). أما عن علاقة الانزيمات وتثبيط المرض فهو واضح فى جدول (رقم ٣٨). 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 ٢٢). وقد وجد أن السلالة TF1-R6 لها قدرة عالية على التطفل الفطرى، ووجد أنها تستعمر ٦٣٪ من الأجسام الحجرية للفطر الممرض، بينما السلالات TF- 62 و TF- 46 لم تستعمر أى جسم حجرى.

كانت تجارب الصويا 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* وتقع فى المعلق الجرثومى للفطر المضاد *T.flavus* بتركيز ١٠^٧ جرثومة/ مل، ثم بعد ذلك يؤخذ جسم حجرى واحد ويوضع على بعد نصف سم من بذرة الفاصوليا، ثم تغطى البذرة والجسم الحجرى بحوالى ١٥٠ غرام تربة رملية. تحفظ الأوعية فى الصويا الزجاجية على حرارة ٢٥ - ٣٠ م° تقدر أعراض المرض (عفن الساق) كل يوم لمدة ثلاثة اسابيع بعد الانبات.

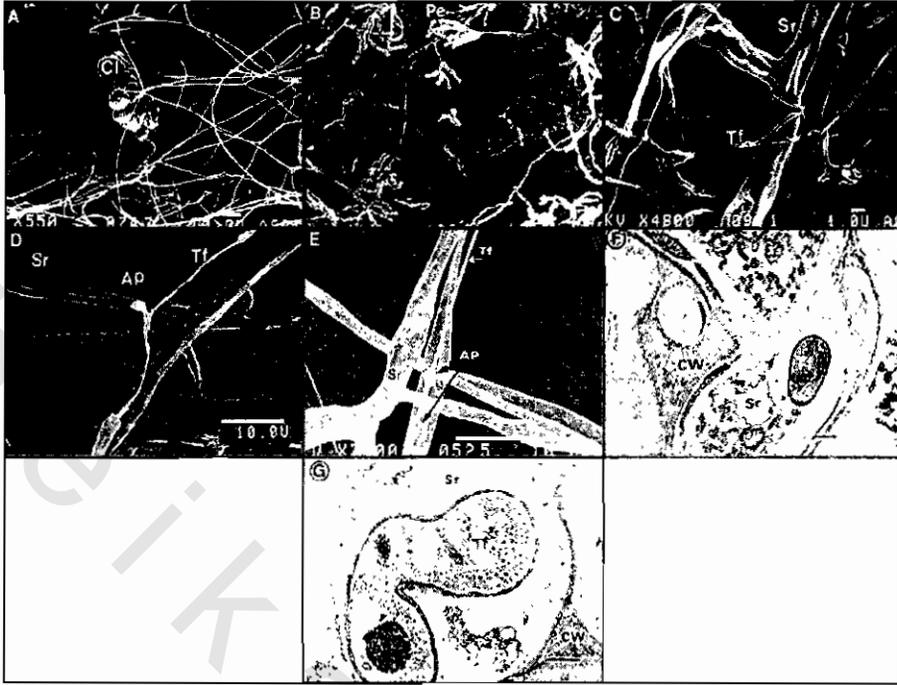
جدول رقم ٣٧ : النشاط الإنزيمي ونشاط سلالات *T.flavus*ضد الفطرين *S.rolfsii* و *V.dahliae*.

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

ملاحظات على الجدول:

- Chitinase = مكرومول من N-acetyl glucoseamine / ساعة / ملغم من البروتين .
 Cellulase و Glucanase = مكرومول غلوكوز / ساعة / ملغم من البروتين .
 Glucose oxidase = مكرومولز H2O2 / دقيقة / ملغم من البروتين .
 نشاط التصاد الحيوى للفطر *V. dahliae* = أعلى تخفيف من راشح المزرعة الذى يثبط إنبات الأجسام الحجرية الصغيرة للفطر كلية .

فى دراسة فسيولوجية على الفطر *T.flavus*، وجد أن أفضل نمو خضرى وإنتاج للهيفات الفطرية، يحدث عند تنميتها على سكريات معقدة مثل عديدات التسكر (٣٢ غرام/ لتر من البيئة) و *B-glucosides* (٢,٤ غرام لكل لتر من البيئة). وكان أقل نمو للهيفات على



شكل رقم (٢٢) :

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

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

B : تحضين الأجسام الحجرية المحقونة تحت الإضاءة المستمرة يؤدي إلى النموات الخضرية، وتكوين بنسلياً عديدة (Pe).

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

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

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

مقياس الرسم = 1 ميكرومتر.

السكريات الأحادية. أما إنتاج الجراثيم الاسكية فيتم بعد ٦ أسابيع من النمو على بيئة صلبة وتحسينها على ٣٧ °م. وجد أن أفضل مصدر غذائي هو السكريات القليلة التسكر-oligosaccharides؛ حيث تعطي ٢,٩ x ١٠^٨ جرثومة/ ٥,٥ سم قطر بيئة في أطباق بتري، أما Monosaccharides فتعطي ١,٦ أو ١,٤ x ١٠^٨ جرثومة/ ٥,٥ سم قطر في البيئة في أطباق بتري. بالنسبة لمصدر الكربون، ليست هناك علاقة بين تكوين الجراثيم الإسكية والوزن الجاف للهيفا. أما المصادر المختلفة للنيتروجين فتعطي من صفر الى ١٠^٩ جرثومة اسكية لكل ٥,٥ قطر بيئة في طبق بتري و ١٠^{-٤} - ١٠^{-٥} غرام من الهيفات الجافة لكل مل. وبشكل عام فإن مصدر النيتروجين، الذي يؤدي لأفضل إنتاج من الجراثيم الإسكية يعطي أيضاً أفضل إنتاج من الهيفات الجافة. ولقد وجد أن عدد الجراثيم الاسكية يزيد كلما زادت نسبة C/N من ٥ : ١ الى ٣٠ : ١، هذا التأثير يكون أكثر وضوحاً كلما كان C:N يزداد من ٥ : ١ الى ١٥ : ١. في النسبة المنخفضة من C:N أقل من ١٥ : ١ فإن المعاملة بمادة hypoxan-thine كمصدر للنيتروجين يؤدي الى زيادة معنوية في نمو ووزن الهيفات منه في حالة المعاملة بترترات الأمونيوم. لا يوجد فرق معنوي عندما يكون C:N مساوياً أو أكبر من ١٥ : ١.

كان حدوث مرض ذبول الفيرتسليم أقل بنسبة ٥٠% على نباتات الباذنجان العاملة تربتها بالجراثيم الاسكية الناتجة من مزرعة نامية على بيئة PDA بالمقارنة مع نباتات الباذنجان المعاملة تربته بالجراثيم الاسكية الناتجة من مزرعة نامية على بيئة بها hypoxan-thine + لاكتوز أو مالتوز. وبالتالي فإن مصادر الكربون والنيتروجين التي تزيد قليلاً إنتاج الجراثيم الاسكية للفطر *T.flavus* تخفض كفاءة المقاومة الحيوية لذبول الفيرتسليم بالمقارنة مع الجراثيم الإسكية الناتجة من بيئة PDA. (جدولان رقم ٣٨، ٣٩).

الجدول (٣٨) : العلاقة بين النشاط الإنزيمي في راسح مزرعة سلالات الفطر *T.flavus* ومقدرتها على التطفل على الاجسام الحجرية للفطر *S.rolfsii* لخفض مرض عفن ساق الفاصوليا في تجارب الصويا الزجاجية .

Correlation	Coefficient	الإنزيم
خفض المرض	التطفل الفطري	
٠.٩٥٢	٠.٨٩٥	Chitinase
٠.٣٢٣	٠.٢٨٣	Glucanase
٠.٣٨٧	٠.٥٤٦	Cellulase
٠.٤٢٦	٠.٥٤٤	Glucose oxidase

ملاحظات على الجدول

Correlation و Coefficient معتمدة على جدول (رقم ٣٧) .

الأرقام معنوية من صفر على $P = 0.05$.

جدول رقم (٣٩) : العلاقة بين المقدرة على التطفل على الاجسام الحجرية للفطر *S.rolfsii* ، وانخفاض في شدة مرض عفن ساق الفاصوليا .

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

ثانياً: الأجناس البكتيرية

I : الجنس *Pseudomonas*

مقدمة :

أفراد هذا الجنس بكتيريات على شكل عصيات مستقيمة، الى منحنية، ذات أبعاد (٠,٥ - ١) x (١,٥ - ٤) ميكرون، متحركة بواسطة سوط واحد أو أكثر. يوجد أنواع كثيرة من هذا الجنس شائعة كمستوطنات تربة أو الماء النقي 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 نميتها 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 التي تدخل في المقاومة الحيوية لأمراض النبات هي *Pseudomonas fluo-rescens* خاصة السلالة *CHAO*. والنوع الثاني *P.putida* والثالث *P.aevuginosa*.

السلالة *P.fluorescence CHAO*

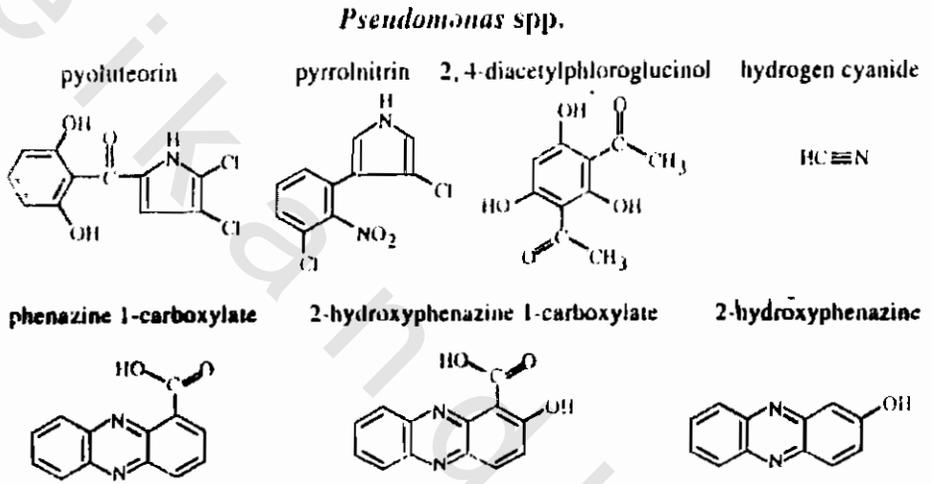
هناك بعض السلالات من البكتيريا الوميضة *P.fluorescence* المستعمرة لجذور النبات، تستطيع أن تثبط أمراضاً نباتية مختلفة كامنة في التربة، وبالتالي تزيد النمو وكمية الإنتاج في المحاصيل الزراعية. يكون تثبيط الكائنات الممرضة التي تهاجم الجذور عن طريق إنتاج مواد تسمى مضادات ميكروبات أو مركبات حديد مخلبية *Iron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

1 - Phenazine - 1 - Carboxylic acid.

2 - Hydrogen Cyanide

- 3 - 2,4 - diacetyl phloroglucinol (PhI)
- 4 - Oomycin A
- 5 - Pyoluteorin (Plt)
- 6 - Pyrrolnitrin

يبين (شكل ٢٣) الصيغ الكيميائية لبعض هذه المركبات:



شكل (٢٣) : بعض المركبات الكيميائية التي تفرزها أنواع مختلفة من البكتيريا المبيضة، ولها دور في تثبيط الأمراض النباتية.

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

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

البكتيريا *P.fluorescens CHAO*، عزلت أصلاً من تربة مثبطة لمرض العفن الأسود لجذور الدخان، حيث وجد أنها تقى نباتات مختلفة من أمراض الجذور المتسببة عن أنواع مختلفة من الفطريات الممرضة النباتية. هناك نواتج تمثيل ثانوية عديدة تنتج بواسطة السلالة *CHAO*، قد ثبت بأنها تلعب دوراً في تثبيط المرض، هذا ما وجدته Ked & Defago سنة ١٩٩٦، أهم هذه النواتج هما HCN و Ph1، حيث يساعدان في تثبيط العفن الأسود في الدخان. كذلك وجد أن ال Ph1 يدخل في تثبيط المرض الماحق (Take all) في القمح. أما المركب Plt فقد وجد أنه يساهم أيضاً في وقاية بعض أنواع النباتات من الإصابة بمرض سقوط البادرات المفاجيء، إلا أن هناك أدلة واضحة تبين أن دخول Pvd المذكور سابقاً في المقاومة الحيوية لأمراض الجذور غير أكيد. كذلك فإن السلالة *CHAO* تنتج أيضاً Pch و Sal، ولكن دورهما في تثبيط الأمراض لم يدرس جيداً.

إن الجين الكروى المنظم Global activator والذي يطلق عليه *Gac A* في السلالة المذكورة سابقاً، ينظم سلوك عديد من نواتج التمثيل الثانوية من *HCN*، *Ph1* و *Plt* وإنزيمات *Tryptophan side-chain oxidase*، وأنزيم *Protease* و *Phospholipase C*. إن جين تنظيم الاستجابة *Gac A* وجين تطابق الإحساس *Lem A* هما مكونان مهمان في الجنس *Pseudomonas*. إن الجين *Gac A* غير مطلوب لإنتاج مركبات الحديد المخيلية في *CHAO*، ولكن في الطفرات السالبة لإنتاج *Gac A* من *P.fluorescens* سلالة *BL 915*، فإنها تفشل في بناء عديد من عوامل المضادات الفطرية مثل *HCN* و *Pyrrrolnitrin*، وتضعف كفاءتها في تثبيط الأمراض. أيضاً وبطريقة مماثلة فإن الطفرات السالبة لإنتاج *Gac A* من السلالة *CHAO*، تكون مقدرتها على تثبيط عفن الجذر الأسود في الدخان منخفضة بشدة بالمقارنة مع السلالة الأصلية موجبة الإنتاج للجين *Gac A*.

كذلك فإن السلالة CHAO تثبط عديداً من الأمراض النباتية المختلفة المتسببة عن فطريات كامنة في التربة. تنتج البكتيريا الوميضة مواد مضادة ميكروبية ذكرناها سابقاً، والتي كلها ضرورية لتثبيط المرض، إلا أن هناك مشتقات من السلالة CHAO ذات طفرة في الجين الكروي المنظم (Gac A) والذي يعد غير قادر على إنتاج HCN، Pht، Ph1، وهذا يفشل في وقاية نباتات ذات الفلقتين مثل Cress، والخيار ضد مرض سقوط البادرات المتسبب عن الفطر *Pythium ultimum*. وبالمقابل فإن الطفرات السالبة لإنتاج Gac A تستطيع أن تقى نباتات ذات الفلقة الواحدة وخاصة النجيليات مثل القمح والذرة ضد سقوط البادرات والذي يتسبب عن الفطر السابق نفسه. وتحفظ القمح من الإصابة بالمرض الماحق. وعلى أية حال فإن الطفرات السالبة في إنتاج Gac A، تنتج كثيراً من Pvd و Pch. للحصول على تفسير أكبر للوقاية من المرض الذي يتم بواسطة السلالة السالبة لـ Gac A، يجب دراسة الطفرات الثنائية السالبة في إنتاج Gac A و Pvd مثل السلالة CHA-496 التي أنشئت عن طريق الإحلال الجيني.

السلالة CHA-496 تنتج كميات كبيرة من Pch و Sal بالمقارنة مع السلالة CHAO، وتحفظ القمح من الإصابة بالفطر *P.ultimum* و *Gaeumannomyces graminis* مسبب المرض الماحق (جدول رقم ٤٠)، بينما نبات الـ Cress والخيار لم يمكن حفظهما. إن إضافة كلوريد الحديدك يكبح إنتاج Pch و Sal بواسطة السلالة CHA-496 في المعمل، ويفسد وقاية النبات في عالم التربة الصغير.

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

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

تقدير المرض الماحق فى القمح		تقدير سقوط البادرات		الحديد	السلالة البكتيرية
دليل المرض	الوزن الطازج للنبات ملغ	% إصابة مرضية	الوزن الطازج للنبات ملغ		
بدون مع فطر	بدون مع فطر	بدون مع فطر	بدون مع فطر	—	كنترول
صفر ٢.٤	٦٢٧ ٣٠٣	صفر ٨٠	٦١٥ ٣٣٣	—	CHAO
صفر ٠.٧	٦٢٤ ٦٢٣	صفر ٤٠	٥٧٨ ٤٤٩	—	CHA-496
صفر ١.٧	٦٣٦ ٥١٥	صفر ٣٥	٥٩٧ ٤٥٢	—	كنترول
صفر ٢.٣	٥٩٢ ٣٢٦	صفر ٨٠	٥٧٨ ٢٩٤	+	CHAO
صفر ٠.٤	٥٨٥ ٥٥٩	صفر ٧٥	٥٨٠ ٤١٩	+	CHA-496
صفر ٢.٠	٥٦٤ ٣٩٤	صفر ٧٠	٥٧٠ ٣٣٧	+	

ملاحظات على الجدول:

السلالة CHAO هي الاصلية اما CHA - 496 فهي طفرة من السلالة الاصلية لا يوجد فيها Gac A ولا Pvd. كان يضاف الحديد على شكل كلوريد الحديدى الى التركيز النهائى من ٩.٩ ميكروغرام حديد / g^{-1} من التربة الجافة. كان دليل المرض يقسم من صفر الى ٤، حيث إن صفر بدون مرض، أما ٤ تموت النباتات (Keet et al سنة ١٩٩٢).

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

أضعاف، هذه المضادات هي Plt و Ph1 في المعمل . السلالة CHAO/ pME 3090، أيضا تنتج كمية كبيرة من ال Plt و Ph1 في منطقة الرايزوسفير في القمح المصاب أو غير المصاب بالفطر *P. ultimum*. إن كفاءة المقاومة الحيوية للسلالة الاصلية والسلالة المركبة قد تم مقارنتهما باستعمال اتحادات من العائل - الكائن الممرض المختلفة في نظام الجينوتايب. لا تتأثر وقاية القمح بالإنتاج الكبير من المضادات الحيوية، لا الوقاية ضد *P. ultimum* ولا ضد فطر المرض الماحق *G.g.tritici* ولا يتأثر نمو نبات القمح. وبالمقابل فإن السلالة المركبة *CHAO/pME 3090* أظهرت زيادة كبيرة في وقاية الخيار من مرض ذبول الفيوزاريوم وفطر *Phomopsis sclerotoides* بالمقارنة مع السلالة الاصلية *CHAO*. السلالات المنتجة كميات كبيرة من المضادات الحيوية، تحفظ جذور نبات الدخان بشكل معنوي أفضل ضد الفطر *Thielaviopsis basicola* من السلالة الاصلية، ولكن تخفض بشكل كبير نمو نباتات الدخان، وتكون سامة أيضا على نمو نباتات الذرة السكرية. عندما تنمو السلالة المركبة على بيئة King's Bagar او مولت آجار، فإنها تثبط جميع الكائنات الممرضة بشكل أفضل مما تعمله السلالة الاصلية *CHAO*. إن مادتي Plt و Ph1 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. وبالتالي يمكن القول بأن الانواع النباتية أفضل من الكائن الممرض في تحديد فيما إذا كانت Cosmid 3090 في *P.fluorescens* السلالة CHAO تؤدي الى تحسين المقاومة الحيوية وتثبيط المرض (جدول رقم ٤١).

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

التثبيط ملم على بيئة مولت آجار		التثبيط ملم على بيئة King's agar B		الفطر المستعمل في التجربة
CHAO/ pME 3090	CHAO	CHAO/ pME 3090	CHAO	
٤.٢	١.٧	١٠.٨	٣.٢	<i>Pythium ultimum</i>
١٦.٨	١٣.٥	١١.٣	١٠.٤	<i>G.graminis var. tritici</i>
١٣.٦	١٠.٤	—	—	<i>Thielaviopsis basicola</i>
٥.٧	٣.٧	٥.٦	٣.٦	<i>Rhizoctonia solani</i>
٨.٨	٤.٥	١.٢	٠.٧	<i>F.oxysporum F.sp cucumerinum</i>

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

دور السلسيلك أسد في المقاومة المستحثة

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

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

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

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

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

II : الجنس Bacillus

مقدمة :

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

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

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

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

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

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

من تلك الأمثلة ما يلي:

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

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

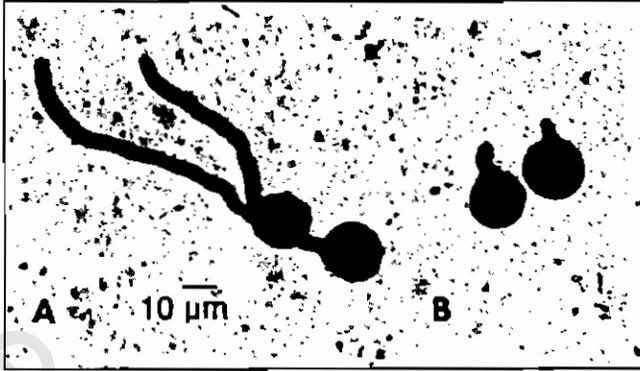
٣ - *B.subtilis GBO-3* لمقاومة مرض سقوط البادرات فى القطن.

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

ذكرت بعض التجارب التي أجريت فى الصين، نجاح استعمال أنواع من البكتيريا *Ba-cillus* كعوامل تسبب زيادة الإنتاج، عند إدخالها للتربة كمعاملة بذور، على عديد من المحاصيل النباتية، من ضمنها القمح والرز. ولقد ذكر *Mavingui et al* سنة ١٩٩٢ أن تجمعات *B.polymyxa*، فى منطقة الرايزوسفير والرايزوبلين تختلف عن تلك الموجودة فى Bulk soil، ومن الممكن عزل سلالات من أنواع *Bacillus* والتي 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، فهي تقى بادرات البرسيم الحجازى من الإصابة بمرض السقوط المتسبب عن *Phytophthora medicaginis* وبادرات الخيار من الإصابة بالفطر *P.nicotianae*، وقمار الخيار من العفن المتسبب عن



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

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

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

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

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

ملاحظات على الجدول :

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

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

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

ملاحظات على الجدول :

كل أنبوبة اختبار تحوى ٣ بذور، والنتيجة مأخوذة من ٥٤ بادرة. الكنترول كلها سليمة. Pm تعنى ٣ x ١٠^٣ جرثومة هديبية من الفطر الممرض أضيفت إلى كل أنبوبة اختبار. Trypticase Soy broth = TSB ، ZmA = المضاد الحيوى الأول.

العزلتان *AF-1* و *A13*

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

أما العزلة *AF-1*، كان أول عزل لها من الخلايا المتحللة للفطر *Sclerotium rofsii*، ولقد وجد أنها ذات قدرة تثبيطية في المعمل لعدد من الكائنات الممرضة النباتية وتحسن النمو في كثير من أنواع النباتات في التربة المبخرة ببخار الماء الساخن والتربة الطبيعية. إن العزلة *AF-1* تعتبر من أهم العزلات التابعة للبكتيريا *B.subtilis*، ولقد ذكر بأنها تعمل على شكل رايزوبكتيريوم مشجع لنمو النبات يسمى (ذكرنا ذلك سابقاً في الفصل الأول) *PGPR* وكعامل مقاومة حيوية لمقاومة مرض العفن التاجي في الفول السوداني، وكذلك تشجع تكوين العقد الجذرية. إن بكترة البذور بالسلالة *AF-1* يسبب زيادة مستويات الفينولات الكلية وأنزيمات Lipoxigenase و Peroxidase و Phenylalanine ammonia lyase في البادرات المبكرة، يدل على إمكانية تدخل المقاومة المستحثة في النبات العائل في مقاومة الأمراض التي تستعمل فيها *AF-1*. إن مقدرة البكتيريا *B.subtilis* على استعمار الجذور باستمرار والبقاء حية لمدة طويلة عند إدخالها في منطقة الرايزوسفير/ الرايزوبلين لنبات الفول السوداني، 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* في أوقات مختلفة وعلى فترات مختلفة، لوحظ التصاق الخلايا البكتيرية مع الميسيليوم الفطري، وتتكاثر الخلايا البكتيرية في مكانها وتستعمر سطح الميسيليوم. إن نمو السلالة *AF-1* يؤدي الى تحطيم جدار الخلية، ويتبع ذلك تحلل الخلية. أما حقن السلالة *AF-1* في بيئة محتوية *A.niger* بعد مدة، صفر، ٦ و ١٢ ساعة فإنها تثبط أكبر من ٩٠٪ من النمو الفطري. أما عند حقنها في البيئة بعد ١٨ و ٢٠ ساعة من بداية نمو الفطر، فإن النمو الفطري يثبط بنسبة ٧٠٪ و ٥٦٪ بالترتيب إذا قيس بالنسبة للوزن الجاف. أما في المزارع المزدوجة Dual Culture، فإن النمو الفطري لم يكن متبوعاً بتكوين جراثيم. التحضيرات الميسيليومية من الفطر *A.niger* عند إضافتها كمصدر أولى للكربون يدعم نمو

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

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

لقد ذكر في مراجع كثيرة أن الكائنات الحية الدقيقة القادرة على تحليل الكائنات الأخرى، تلعب دوراً مهماً في المقاومة الحيوية لأمراض النبات، هذا التحليل يتم بواسطة عديدة من الإنزيمات من بينها الإنزيمات المحللة للشيتين، وهذا يمكن تطبيقه على البكتيريا *AF-1* والقول بأنها قادرة على تحليل الشيتين *Chitinolysis*، وبهذه الطريقة تقوم بدور المقاومة الحيوية الفعال ضد الفطر *A.niger*.

جدول رقم (٤٤) : تأثير البكتيريا *AF-1* على نمو الفطر *A.niger* في المزارع المزدوجة السائلة.

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

ملاحظات على الجدول:

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

البكتيريا *B. subtilis Cot-1* في الصوبات الزجاجية الضبابية

الصوبات الزجاجية الضبابية *Fogging glasshouses*، هي عبارة عن صوبات زجاجية تزود النباتات التي تنمو فيها بالرطوبة العالية باستمرار. تستعمل الآن على نطاق واسع لإحداث تأقلم لوسائل التكاثر الدقيقة والحساسية في 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 التي يتكشف منها نظام جذرى ضعيف ذو طبقات شمعية وكيوتكل قليلة، وتغور غير منتظمة خلال فترة النمو في المعمل. إن كلا من التشوهات الفسيولوجية والظروف البيئية تزيد في قابلية النباتات للإصابة بالكائنات الممرضة الفطرية بعد نقلها إلى بيئة ال *Compost* (مزارع من المواد العضوية المتحللة). بمعزل عن العفن الرمادى المتسبب عن الفطر *B.cinerea* والذي هو مستوطن الصوبات الزجاجية، فإن دخول الكائنات الممرضة *Pythium*، *Phytophthora* إلى الصوبات الزجاجية الضبابية يسبب فقداً كبيراً في البادرات نتيجة الإصابة بمرض سقوط البادرات المتسبب عن الفطرين السابقين، وهذا يسبب خسائر اقتصادية كبيرة في شركات إنتاج البادرات من المحاصيل المحسنة أو التي تخضع لتجارب الهندسة الوراثية أو مزارع النسخ. كذلك فإن هذين الفطرين يسببان مشاكل كبيرة في مراقد البذور. إن استعمال المبيدات الفطرية *Prophylactic* ثلاث

مرات في الأسبوع هي الطريقة المقتنعة في حفظ النباتات ضد الإصابة بالفطريات في الصوبات الزجاجية الضبابية، ولكن هذه المبيدات لها مآخذ كبيرة، مما أدى إلى الاتجاه إلى المقاومة الحيوية.

إن البكتيريا Cot-1 قادرة على منع حدوث مرض سقوط البادرات المنسبب عن كل من *Pythium* و *Phytophthora* في كثير من النباتات مثل *Photinia*، *Hemer-*، *ocallis* وبادرات الجنس *Brassica* تحت ظروف الرطوبة العالية جداً، وفي الصوبات الزجاجية الضبابية. بالنسبة لـ *Photinia* فإن كفاءة المقاومة الحيوية تكون مشابهة للنتيجة المتحصل عليها من استعمال المبيد الفطري *Metalaxy*، عندما يكون تركيز الكائن المضاد المضاف للجذور أكبر من أو يساوي 3×10^5 وحدة تكوين مستعمرات/ غرام طازج من الجذور (RFW) Root Fresh weight ويكون اللقاح الفطري للكائن الممرض أقل من أو يساوي 10^2 جرثومة بيضية / غرام بيت. تستعمل البكتيريا *Cot-1* النظام الجذري المكتشف في *Photinia* (micro plants) وبادرات *Brassica* النامية في البيت *Peat* خلال 28 يوماً في الحقل في فترة التأقلم في الصوبات الزجاجية الضبابية. عند استعمال اللقاح 4×10^6 و 3×10^5 وحدة تكوين مستعمرات/ غرام RFW، فإن أعداد الجراثيم تبقى بين 10^5 و 10^6 وحدة تكوين مستعمرات/ غرام RFW في المقاطع الأكبر عمراً من النظام الجذري وبين 10^4 و 10^5 وحدة تكوين مستعمرات على مقاطع قمة الجذر. إن استعمال البكتيريا *Cot-1* يثبط قليلاً مرض سقوط البادرات على نبات *Daphne*. إن ظهور المقاومة الضعيفة في جذور *Daphne* وتثبيط البكتيريا *Cot-1* بواسطة البيئة الميتة لنسج مزرعة *Daphne* يؤدي إلى القول بأن النشاط الضعيف للمقاومة الحيوية يكون بسبب انطلاق مركبات مثبطة بواسطة جذور *Daphne* (جدول رقم ٤٥، ٤٦).

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

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

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

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

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

ملاحظات على الجدول: المبيد الفطرى المستعمل *Metaxyl*.

الجراثيم البيضيه المستعملة ٢١٠ جرثومة/ غم بيت. المخلوط يستعمل فيه ١٠ x ٥٠ جرثومة بيضية/ غرام بيت.

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

المعاملة	الجرعة	لقاح الفطر <i>Pythium</i> (جرثومة بيضية/ غرام بيت)			
		١١٠	٢١٠	٣١٠	٤١٠
مبيد ميتا ليكسائل	—	٦	٢	٦	٣
Cot - 1	٩١٠	٦	٧	١٤	٦١
Cot - 1	٨١٠	٢	٦	٥٤	٦٩
Cot - 1	٧١٠	٣٠	٧٤	٩٧	٩٥
Cot - 1	٥١٠	٩٥	٩٤	٩٦	٩٨
كنترول	—	٩٤	٩٩	٩٦	٩٨

III : الجنس *Streptomyces*

مقدمة :

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

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

الدراسات المستفيضة التي أجريت على راسح مزارع الجنس *Streptomyces* لمقاومة أمراض المجموع الخضري، أعطت نتائج تبين أن حوالي تسعة من عشرة منتجات مختبرة تثبط على الأقل مرضاً واحداً في الصويا الزجاجية. لقد ذكر Reddi & Rao أن عزلات من *Streptomyces ambofaciens* كانت قادرة على مقاومة مرض سقوط بادرات الطماطم المتسبب عن الفطر بثيم، ومرض ذبول الفيوزاريوم في نباتات القطن في الأراضي المحقونة

صناعياً. هناك تشبيط مماثل لأمراض الجذور قد تم الحصول عليه، من قبل كثير من الباحثين وذلك باستعمال الـ *Streptomyces* على شكل جراثيم أو ميسيليوم أو اتحادات من كليهما في مرافد الإنبات في الصوبات الزجاجية. ومن الجدير بالذكر أن Rothrock & Gottlieb سنة ١٩٨١، ذكروا أن هناك نتائج واضحة تثبت أن مقاومة عفن الجذر الرايزوكتوني في نباتات البسلة باستعمال *S.hygroscopicus var. geldanus* في تربة معقمة محقونة صناعياً، تعتمد على تركيز المضاد الحيوى Geldanamycin (تقارب ٢٠ ميكوغرام/ غرام تربة) الذى يفرزه الفطر المذكور في التربة. هناك كثير من الدراسات قد أثبتت الأهمية الكمية والنوعية لأنواع الجنس *Streptomyces* في منطقة الرايزوسفير؛ حيث إنها من الممكن أن تعمل كمشجعات نمو نباتية، بالإضافة الى استعمار الجذر حتى لو كانت بتركيز ٢١٠ - ١٠٠ وحدة تكوين مستعمرات من بين السلالات البكتيرية في منطقة رايزوسفير القمح.

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

طرق فعل الجنس *Streptomyces* في المقاومة الحيوية:

- ١ - يمكن أن يقوم الجنس *Streptomyces* بتثبيط نمو الجراثيم، كما في 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 في إنتاج المضادات الحيوية في المعمل، وتؤثر على كثير من الفطريات الممرضة للنبات. من أهم هذه المضادات Polyenes، Cinnamycin، وهي مركبات عديدة البروتين Polypeptide تنتج بواسطة *S.cinnamomeus* كذلك فإن المضاد الحيوى Heptanes من أكثر المضادات فعالية حيث تفرزه أنواع أخرى من الجنس نفسه. أما النوع *S.hygroscopicus var. geldanus*

nus فإنه ينتج المضاد الحيوى Geldanamycin ذا تأثير فعال ضد عديد من الممرضات النباتية الفطرية.

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

1- Hemipyocianine

2 - Chlororaphin

3 - Phenazine - A

4 - Carboxylic acid

5 - Phenazine - B

الفطريات التي تقاوم حيويًا باستعمال أنواع الجنس *Streptomyces*

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

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

٣ - *Rhizoctonia solani* فى المعمل والحقل.

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

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

٦ - كذلك وجد أن غمر البذور 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* في تربة معقمة إذا حقنت بالكائن المضاد قبل ساعتين من حقنها بالفطر الممرض.

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

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

تأثير الجنس *streptomyces* على النبات العائل:

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

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

لقد وجد أن بعض نباتات الذرة التي تنمو مترافقة مع الفطر *Pythium graminicola* في تربة معاملة بمضادات حيوية غير نقية من الجنس *Streptomyces*، كانت أطول وذات جذور أعمق في التربة، من تلك النامية في تربة غير معاملة والتي تحتوى *P.graminicole* فقط. كذلك وجد أن معاملة نباتات الموز بأنواع من الاكتينومايستس مضادة أو ضعيفة التضاد في التربة نفسها التي تنمو فيها النباتات، تؤدي إلى زيادة كبيرة في النمو أكثر من تلك المعاملة بالاكتينومايستس 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، في بعض أنواع 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 فهي تحسن مظهر النبات ويكون إنتاج الثمار أفضل منه في الكنترول. كذلك وجد أن بعض أنواع الجنس *Streptomyces* تخفض حدوث الأضرار لحبوب الشعير وتزيد النمو وتسبب زيادة الوزن الطازج للنباتات الناتجة من بذور غير مصابة بالمرض.

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

جدول رقم (٤٧) : التأثير التثبيطي لأنواع من Streptomyces النامية على بيئات

مختلفة ضد الفطر Fusarium tabacium .

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

جدول رقم (٤٨) : التأثير المثبط لأنواع من Streptomyces النامية على بيئة (نشا-

نترت) ضد فطريات ممرضة مختلفة.

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

كفاءة السلالة WYEC - 108 في المقاومة الحيوية لاعفان البذور والجذور

تظهر السلالة WYEC - 108 *Streptomyces lydicus* قوة تضاد في المعمل، ضد الكائنات الممرضة النباتية الفطرية، في اختبارات الأطباق، وذلك عن طريق إنتاج مضادات حيوية خارج الخلية ناتجة عن عمليات ال *Metabolites*. عند زراعة كل من *Pythium ul-* *timum* أو *R.solani* في بيئة سائلة مع هذه السلالة، يلاحظ تثبيط نمو الفطريات. أما عند استعمال جراثيم هذه السلالة او الميسيليوم المأخوذ منها، على شكل غلاف لبذور البسلة فإن هذا يؤدي الى حفظ البذور من الإصابة بالفطر *P.ultimum* عند زراعة البسلة في التربة الغنية بالجراثيم البيضية. بينما جميع البذور (١٠٠٪) غير المغلفة بأى أجزاء من تلك السلالة (وسائل المقاومة الحيوية) تصاب بالفطر نفسه خلال ٤٨ ساعة بعد الإنبات، أقل من ٣٥٪ من البذور المغلفة بوسائل المقاومة الحيوية ظهرت فيها الإصابة. اما عند زراعة البذور المغلفة بوسائل المقاومة الحيوية في التربة، قبل إدخال الكائن الممرض إليها بمدة ٢٤ ساعة أو بمدة ٩٦ ساعة بعد إدخال الكائن الممرض إليها، فإن أقل من ٢٥٪ من البذور النابتة تصبح مصابة (جدول ٤٩، ٥٠)

الدراسات التي أجريت على مرافد الإنبات، أجريت أيضاً لاختبار التأثير على نمو النبات ومقدرة التثبيط التي تظهرها السلالة موضوع الدراسة، على عفن البذور والجذور المتسبب عن الفطر *Pythium*. عندما تضاف هذه السلالة في تشكيل يتكون من (جراثيم الكائن المضاد + بيت موص + رمل) بتركيز ١٠^٨ وحدة تكوين مستعمرات لكل غرام الى تربة غير معقمة أو تربة معقمة ومحقونة بالفطر الممرض *P.ultimum* المزروعة ببذور البسلة أو القطن، أن هناك زيادة معنوية في متوسط عدد النباتات السليمة، وفي طول النبات ووزن النبات في كلتا الحالتين، بالمقارنة مع نباتات الكنترول غير المعاملة والمزروعة في اراضٍ مماثلة (جدول ٥٢).

أثبتت الدراسات الحقلية أن هيفات أفراد السلالة WYEC - 108 عندها القدرة على الاستعمار والانتقال الى أسفل مع الجذر كلما استطال. تحتاج هذه السلالة لفترة أطول من ٣٠ يوماً حتى يمكن للتجمعات البكتيرية أن تستعمر الجذور المستطيلة الناتجة عن البذور النابتة، وتبقى ثابتة على تركيز ١٠^٥ وحدة تكوين مستعمرات/ غرام في منطقة الرايزوسفير، بينما

تنخفض التجمعات في غير منطقة الرايزوسفير لهذه السلالة على الأقل بنسبة ١٠٠ ضعف (من ١٠٠ إلى ٢١٠) أو أقل وحدة تكوين مستعمرات/ غرام. جدول ٥١.

إن ثبات تجمعات السلالة WYEC - 108 المحضنة على حرارة ٢٥°م في تلك التشكيلات أو في تربة معقمة أو غير معقمة لم يمكن تحديدها. في الظروف الثلاثة فإن تجمعات السلالة المذكورة تبقى ثابتة في حجمها لمدة ٩٠ يوماً أو أكثر. عند وضع بذور كل من البسلة، القطن، والذرة السكرية في أراضٍ غير معقمة أو معقمة محتوية ١٠ وحدة تكوين مستعمرات أو أكثر من السلالة نفسها/ غرام، فإنها تستعمر الجذور المستطيلة. بعد فترة نمو تصل أسبوع واحد فإن تجمعات هذه السلالة ذات تركيز ١٠ وحدة تكوين مستعمرات/ غرام وزن رطب من الجذور، وجدت أنها لاتزال على جذور البسلة في التربة المعقمة المعاملة، وفي الظروف المعاكسة ١٠ وحدة تكوين مستعمرات/ غرام وجدت في التربة غير المعقمة المعاملة.

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

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

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

ملاحظات على الجدول:

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

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

متوسط العدد من وحدات تكوين مستعمرات/ غم وزن رطب من الجذر + SD			نوع التربة
الذرة السكرية	القطن	البسلة	
$310 \times 3,75 \pm 310 \times 6,77$	$410 \times 2,74 \pm 410 \times 2,47$	$510 \times 2,22 \pm 510 \times 3,01$	معقمة
$310 \times 1,05 \pm 310 \times 3$	$310 \times 4,7 \pm 310 \times 5,2$	$410 \times 6,29 \pm 410 \times 9,78$	غير معقمة

ملاحظات على الجدول:

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

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

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

ملاحظات على الجدول:

دليل التضاد +++ تعنى أكبر من ٢ سم، ++ تعنى أقل من ٢ سم وأكبر من ١ سم، + تعنى أصغر من ١ سم وأكبر من نصف سم. (-) تعنى أقل من نصف سم.
 دليل القدرة على البقاء - تعنى دون نمو، + تعنى نمو.
 CMA = مجروش الذرة + آجار. V-8A = عصير طماطم + آجار (٢٥٠ غرام عصير طماطم + ٢,٥ غرام كربونات كالمسيوم توضع فى آلة الطرد المركزى على ٣٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ١٥ دقيقة ثم يؤخذ العائم ليكمل إلى لتر من بيئة V-8A.

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

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