مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (36) العدد (5) 2014
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (36) No. (5) 2014

دراسة تأثير عزلات فطرية في الخصائص الحيوية للفطر *Fusarium oxysporum* (Schl.)

الدكتور محمد طويل*

عفراء مطيع حيدر**

(تاريخ الإيداع 21 / 7 / 2014. قبل للنشر في 29 / 10 / 2014)

□ ملخّص □

نفذ هذا البحث مخبرياً للتعرف على تأثير أربع عزلات فطرية (ثلاث منها للفطر *Trichoderma* sp. حيث أشير لها بالرموز T1، T2، T3 وواحدة للفطر *Aspergillus niger* أشير لها بـ As1) في نمو الخيوط الفطرية، وسرعة تشكل الأبواغ، و إنتاش الأبواغ للفطر *Fusarium oxysporum* المسبب الرئيس لمرض جفاف أشجار التفاح.

بينت الدراسة:

- تفوق عزلات الفطر تريكودرما على عزلة الأسبرجلوس بفروق معنوية في التأثير في نمو ميسليوم عزلة الفيوزاريوم الممرضة عند تطبيق الفيوزاريوم مع وقبل العامل الأحيائي حيث كانت نسبة منع النمو بتاثير العزلة T2 أكبر منها بتأثير العزلات الأخرى، في حين كان التفوق المعنوي للعزلة التجارية T1عند تطبيق الفيوزاريوم بعد العامل الأحيائي ولم يكن هناك فروق معنوية في تأثير العزلات الثلاثة الأخرى.
- التاثير السلبي للعزلات الأربعة في سرعة تشكل الأبواغ، ولوحظ التناسب العكسي بين كثافة تشكل أبواغ الفطر فيوزاريوم ونمو خيوطه الفطرية بتأثير العزلة المحلية T2.
- إضافة إلى التأثير السلبي للعزلات الأربعة بدرجات متفاوتة في إنتاش أبواغ عزلة الفطر *Fusarium oxysporum*، حيث كانت العزلتان T2، As1 متفوقتان معنوياً على العزلتين الباقيتين إذ بلغت نسبة منع إنتاش الأبواغ 72.8 و 47.4 % على التوالي.

الكلمات المفتاحية: *Fusarium oxysporum*، *Trichoderma* spp.، *Aspergillus niger*، مكافحة حيوية.

* **أستاذ– قسم وقاية النبات– كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.**

** **طالبة دراسات عليا(ماجستير)– قسم وقاية النبات– كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.**

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (36) العدد (5) 2014
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (36) No. (5) 2014

A Study of the Effects of Some Fungal Isolates in Biological Characteristics of *Fusarium oxysporum* (Schl.)

Dr. Mohamed Tawil*
Afra' Mutee' Haider**

(Received 21 / 7 / 2014. Accepted 29 / 10 /2014)

□ ABSTRACT □

The research was carried out in laboratory to study the biological effects of four fungal isolates (three of them that were T1, T2, T3 belonged to *Trichoderma* spp., and one which was As1 belonged to *Aspergillus niger*) on croissance, sporulation speed and spores germination of *Fusarium oxysporum* (Schl.) which is the main causal for pome wilt disease. The results showed that the four examined isolates affected in the negative on the croissance, sporulation speed and spore germination but in defferent degrees, whereas the indigenous isolate of *Trichoderma* sp. Which was called T2 showed superior at the inhibitory effect on croissance for *Fusarium oxysporum* isolate, also T2 and As1 showed superior at the inhibitory effect on germination percentage for *Fusarium oxysporum isolate* (The percentages were 72.8% and 47.4% respectively).

Key words: *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* spp. *Aspergillus niger*, biological control.

*Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.
**Postgraduate Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.

مقدمة:

لوحظ خلال العقدين الأخيرين وجود ظاهرة جديدة في بساتين التفاح لم تكن معروفة سابقاً في سوريا، تتمثل بجفاف الأشجار خلال فترة قصيرة لا تزيد عن موسمين وموت الشجرة بعد ذلك. حيث لوحظت هذه الظاهرة لأول مرة في منطقة القساطل شمال محافظة اللاذقية في عام 1995 (طويل وآخرون، 2003)، وازداد انتشارها لتصبح من مشاكل زراعة التفاح خاصة في محافظتي اللاذقية وإدلب. هذا وقد بين طويل وآخرون عام 2002 أن العامل المسبب الأكثر تردداً لهذا المرض هو الفطر فيوزاريوم، لاسيما النوع *Fusarium oxysporum*، حيث تم تحديده في العينات المدروسة إضافة إلى أنواع أخرى مثل *F. solani*؛ *F. compactum*؛ *F. avenaceum* التي تعتبر من الفطور المساهمة والمسؤولة عن ظواهر الجفاف وتعفن الجذور.

والفيوزاريوم *Fusarium* sp. جنس فطري من ساكنات التربة عالمي الانتشار يتبع فصيلة Tuberculariacae التابعة لرتبة Moniliales من صف الفطور الناقصة Deuteromycetes. أما الطور الجنسي لغالبية أنواعه فيتبع الجنس *Gibbrella* وبعضها للجنس *Nectria* التابعين لرتبة Hypocreales من صف الفطور الزقية Ascomycetes (Agrios, 2005).

تبدو مستعمرة الفطر *Fusarium oxysporum* بمظاهر مختلفة على مستنبت البطاطا والدكستروز آغار (PDA) وذلك حسب الشكل النوعي له لكن ففي أغلب الحالات يظهر الميسليوم أبيض اللون أولاً ليتغير بعد ذلك إلى ألوان مختلفة تتراوح من زهري غامق إلى بنفسجي (Smith *et al.,* 1988)، ويشكل الفطر *Fusarium oxysporum* حوامل كونيدية conidiophores شفافة، بسيطة، وقصيرة أو غير متميزة بشكل جيد عن الخيوط الفطرية hyphae بحيث تحمل كتل الأبواغ على قممها. الأبواغ الفياليدية الكونيدية conidia phialosporous شفافة، وهي نوعان هما: الأبواغ الكونيدية الكبيرة Macroconidia هلالية الشكل، مع خلايا قمية مستدقة قليلاً، وخلايا قاعدية معقوفة hooked basal cells، وهي متعددة الخلايا (Watanabe, 1975). والأبواغ الكونيدية الصغيرة Microconidia متطاولة بيضاوية الشكل، أحادية الخلية (Watanabe, 1975). كما يشكل هذا النوع الفطري أبواغاً كلاميدية Chlamydospores : ذات جدار سميك، كروية، وتتواجد بشكل إفرادي طرفياً أو بينياً، او بشكل زوجي (Watanabe, 1975). ينتج الفطر الأنواع الثلاثة من الأبواغ فوق المستنبتات الغذائية في المختبر وكذلك في التربة، والأبواغ الكلاميدية هي التي تحافظ على بقاء الفطر في التربة في الظروف البيئية غير الملائمة لعدة سنوات محدثة الإصابة الأولية (Agrios, 2005).

إن مكافحة هذا الفطر تتم بتكامل مجموعة طرائق، منها المعاملات الزراعية التي حدَّت من حدوث مرض ذبول البندورة الناتج عن الإصابة بالفطر *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Nelson *et al.*, 1981). واستخدام طرائق المكافحة الأحيائية للحد من تأثيرات هذا العامل الممرض، حيث أثبتت جدواها في مقاومة أمراض الذبول التي تصيب العديد من المحاصيل الحقلية والخضراوات وعدداً من الأشجار المثمرة والحراجية. من أهم الفطور التي أثبت الباحثون فاعليتها في المكافحة الأحيائية للنوع *Fusarium oxysporum* نذكر *Trichoderma* spp.، *Penicilium* spp.، *Aspergillus* spp.، وفطور الميكورايزا (Marois & Mitchell, 1981). وفي بحث أجري في الهند وُجِد أن أنواع *T. viride*، *T. harzianum*، *T. virens* تفوقت على النوع البكتيري *Bacillus subtilis* والمستحضر التجاري Kalisena ™ المنتج من الفطر *Aspergillus niger* في مكافحة الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* المسبب لذبول الحمص، كما وجد أن فعالية أنواع التريكودرما المذكورة ازدادت عند

تطبيقها بالترافق مع المبيد الكيميائي الكربوكسين (Sunil *et al.*, 2007). وعند دراسة التأثير المخبري لبعض العزلات الفطرية (بنسليوم، أسبرجيلوس، تريكودرما) ضد الفطرين Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici و F. solani المسببين لذبول البندورة والباذنجان في الهند من خلال اختبار تأثير الرشاحات الفطرية لهذه العزلات في نمو ميسليوم الفطر فيوزاريوم تفوق الأسبرجلوس بفروق معنوية على البنسليوم والتريكودرما في منع نمو مستعمرة الفيوزاريوم (Dwivedi and Enespa,2013). وفي تركيا أجري بحث آخر لاستقصاء أعداء حيوية للفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* المسبب لمرض عفن القاعدة في البصل من بين 37 نوع فطري تابعة لأربعة أجناس هي (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Thysanophora* spp.) وفيه تم الحصول على خمس عزلات إحداها *Aspergillus niger* منعت النمو الشعاعي للفطر فيوزاريوم بنسبة أعلى من 70% في المستنبتين PDA ، MEA (malt extract agar) وفي نموذجي حقن (أي عند حقن العدو الحيوي قبل الفطر فيوزاريوم، وعند حقنه مع الفطر فيوزاريوم) كذلك أحدثت هذه العزلات تشوهات في ميسليوم وأبواغ الفطر فيوزاريوم فعند الفحص المجهري لميسليوم هذا الفطر لوحظ تكثف السيتوبلازم وتهدم الهيفات (Özer *et al.,* 2009).

أهمية البحث وأهدافه:

بما أن مرض جفاف أشجار التفاح المتسبب عن الفطر فيوزاريوم من المشكلات الحرجة الكفيلة بالقضاء على الشجرة في طور الإنتاج خلال ثلاثة مواسم كحد أقصى، فإنه لابد من البحث عن سبل لمكافحة مسبب هذه الظاهرة بما يتلاءم مع التوجهات الحالية في مكافحة الآفات الزراعية باعتماد حلول مستديمة لا تسيء للبيئة والإنسان.

يهدف هذا البحث إلى التّعرّف المخبري على تأثير أربع عزلات فطرية (ثلاث منها للفطر *Trichoderma* sp. وواحدة للفطر *Aspergillus niger*) في نموّ الخيوط الفطرية، وسرعة تشكل أبواغ عزلة ممرضة للفطر *Fusarium oxysporum*، وحساب نسبة إنتاش أبواغ هذه العزلة تحت تأثير المستخلصات المائية للعزلات الفطرية الأربعة.

طرائق البحث ومواده:

نفذ هذا البحث في مختبر المبيدات التابع لقسم وقاية النبات في كلية الزراعة بجامعة تشرين، خلال الفترة الممتدة من كانون الأول 2013 م حتى نيسان 2014 م.

أولاً). العزلات الفطرية المعتمدة:

1. F1: عزلة محلية للفطر *Fusarium oxysporum* تم الحصول عليها من بستان تفاح مصاب في قرية برمانة المشايخ في محافظة طرطوس واختبرت قدرتها الإمراضية على بادرات تفاح بعمر شهر وعمر ثلاثة اشهر.
2. T1 : عزلة للفطر *Trichoderma* sp. وهي عزلة تجارية (بيوكونت) منشطة في تربة معقمة لغراس تفاح بعمر سنتين.
3. T2، T3 : عزلتان محليتان للفطر *Trichoderma* sp. تم الحصول عليهما من منطقة المحيط الجذري لأشجار تفاح سليمة في قرية برمانة المشايخ.
4. As1 : عزلة محلية للفطر *Aspergillus niger* تم الحصول عليها من منطقة المحيط الجذري لأشجار تفاح سليمة في قرية سلمية في مدينة جبلة.

ثانياً). الاختبارات المنفذة في البحث:

1). دراسة تأثير العزلات الفطرية في نمو ميسليوم الفطر فيوزاريوم:

تم اتباع تصميم القطاعات العشوائية الكاملة، وشملت الدراسة اختبار أربع عزلات فطرية بمعدل أربعة مكررات لكل عزلة.

المستنبت المعتمد في هذه التجارب هو مستنبت البطاطا والدكستروز آغار (PDA)، حيث تم تعقيمها في الأوتوكلاف على حرارة 110 سْ لمدّة 20 دقيقة. بعد إخراج الدّوارق من الأتوكلاف وتركـها حتّى تنخفض حرارتها إلى 45 – 50 سْ تمّت إضافة 1 مل من محلول المضادّ الحيويّ أمبسلين لكل دورق(يحوي 250 مل بيئة) ثم صُبَّ المستنبت في أطباق بتري بمعدل 18 – 22 مل /طبق (4 أطباق لكلّ معاملة تعبّر عن أربعة مكرّرات). بعد تصلّب المستنبت في الأطباق تمّت زراعة الفطر فيوزاريوم بأخذ أقراص بقطر 5 ملم من حواف مستعمرة فطريّة بعمر 5 أيّام وزراعتها على بعد 2 سم عن حافة الطبق لتزرع بعد ذلك على مسافة 4 سم من هذه الأقراص أقراص من مستعمرات بعمر 5 أيام للفطر المضاد، مع العلم أن التأثير الوقائي والعلاجي للفطر المضاد أُخِذ بعين الاعتبار من خلال تنفيذ التجربة وفق ثلاثة نماذج هي:

1) زراعة الفطرين (أي الفيوزاريوم والفطر المضاد) في الطبق ذاته والوقت ذاته.
2) زراعة الفطر فيوزاريوم أولاً وبعد 48 ساعة زرع الفطر المضاد.
3) زراعة الفطر المضاد أولاً وبعد 48 ساعة زرع الفطر فيوزاريوم.

أما الشاهد فحضر بزراعة كل فطر لوحده في أربعة اطباق على بعد 2 سم عن حافة الطبق. تركت الأطباق في الحاضنة على حرارة 23 ± 1 سْ، أخذت النّتائج بشكل يومي بقياس أقطار المستعمرات الفطريّة والشّاهد خلال فترات زمنيّة محدّدة مع الحرص قدر الإمكان على أن يفصل بين القراءة والأخرى فترات زمنيّة متساوية (Tawil; 1985). تمّ التّوقّف عن أخذ القراءات عند حدوث التماس بين الفطرين في الطبق.

ولتحليل النّتائج تمّ الاعتماد على معادلة (Sundar *et al.*, 1995) لحساب نسبة النّموّ المصحّحة في موعد القراءة الأخيرة بالمقارنة مع الشّاهد وفق العلاقة:

$$\text{النّموّ المصحّحة (\%)} = \frac{\text{متوسّط قطر مستعمرة المعاملة}}{\text{متوسّط قطر مستعمرة الشّاهد}} \times 100$$

2). اختبار تأثير العزلات الفطرية في سرعة تشكل أبواغ الفطر فيوزاريوم:

نفذت تجربة الكشف عن التأثير في تشكل الأبواغ باستعمال الأطباق نفسها المخصصة لتجربة التأثير في نمو الخيوط الفطرية (حالة الفطرين معاً)، حيث أخذ في آخر يوم (أي بعد ثلاثة أيام من زراعة الفطر) من التجربة 10 أقراص بقطر 5 ملم من كل مستعمرة للفطر فيوزاريوم من ثلاثة مكررات اختيرت عشوائياً بعد قياس قطرها (المجموع 30 قرصاً لكل معاملة) ووضعت في 50 مل ماء مقطر معقم، حركت لمدة 2 دقيقة يدوياً ثم رُشِّحت عبر قطعة من القطن الطبي للحصول على المعلق البوغي (Tawil; 1985). بعد معرفة عدد الأبواغ في 1 ملم^3 من

المعلق البوغي بواسطة شريحة مالاسيه أمكن معرفة عدد الأبواغ في 50 مل من المعلق البوغي، وبالتالي عدد الأبواغ المتشكلة على وحدة المساحة في كل من معاملات الشاهد والفطر المضاد مع الفيوزاريوم من المعادلة التالية:

$$\text{كـ م} = \frac{\text{ح} \times \text{ك}}{\text{س} \times \text{ع}}$$

حيث: كـ م= عدد الأبواغ المتشكلة على 1 ملم^2 من المستعمرة.

ك = عدد الأبواغ في 1 ملم^3 من المعلق.

ح = حجم المعلق / ملم^3 (50 مل= 5 × 10 ^{4} ملم^3).

س = مساحة القرص الواحد (ملم^2).

ع = عدد الأقراص الكلية (30 قرصاً).

بعد معرفة عدد الأبواغ المتشكلة ضمن وحدة المساحة، ومعرفة متوسط مساحة المستعمرة وعدد أيام التجربة تم حساب سرعة تشكل الأبواغ (ويقصد بها عدد الأبواغ المتشكلة في اليوم الواحد للمستعمرة الواحدة كقيمة متوسطة لأيام التجربة وعدد المكررات لكل معاملة) لكل من الشاهد و المعاملات الأخرى من المعادلة التالية:

$$\text{سر} = \frac{\text{م} \times \text{كـ م}}{\text{ن}}$$

حيث: سر = سرعة تشكل الأبواغ.

م = مساحة المستعمرة / ملم^2 .

ن = عدد أيام التجربة.

كـ م= عدد الأبواغ المتشكلة على 1 ملم^2 من المستعمرة.

ومن ثم تم حساب النسبة المئوية لسرعة تشكل الأبواغ لكل تركيز بالمقارنة مع الشاهد من المعادلة التالية:

$$\%\text{سرعة تشكل الأبواغ} = \frac{\text{سرعة التشكل لكل تركيز}}{\text{سرعة التشكل للشاهد}} \times 100$$

3). اختبار تأثير المستخلصات المائية للعزلات الفطرية في إنتاش أبواغ الفطر فيوزاريوم:

1) حُضرت المعلقات البوغية لعزلات الفطور *Trichoderma* sp. و *Aspergillus niger* بحجم 200 مل لكل منها بكثافة 4 × 10^6 بوغة/ مل، حيث حضر المعلق البوغي لكل عزلة كمايلي: أخذت 10 أقراص بقطر 25 ملم من مستعمرات بعمر سبعة أيام لتلك العزلة وأضيفت إلى 300 مل ماء مقطر معقم وحركت لمدة دقيقة واحدة ثم رشحت باستخدام القطن الطبي ومن ثم قيست الكثافة البوغية باستخدام شريحة مالاسيه لتُجرى بعد ذلك عمليات تخفيف بالماء المقطر المعقم للوصول إلى الكثافة المنشودة في وحدة الحجوم (وهي 4 × 10^6 بوغة/ مل)، ثم أخذت كمية 200 مل من المعلق البوغي الأم لكل عزلة وأضيف لها 1 مل من محلول المضاد الحيوي أمبسلين بحيث أصبح تركيزه 100 جزء بالمليون في المعلق البوغي النهائي.

2) تركت المعلقات البوغية في الحاضنة على حرارة 23 ± 0.5 سْ لمدة 24 ساعة في الظلام.

3) رُشِّح 40 مل من كل معلق باستخدام جهاز مخلية الهواء عبر أوراق ترشيح قطر ثقوبها 45 مكرومتر (وأُعيد الباقي إلى الحاضنة لتكرار العملية بعد 3 و 9 أيام).

4) وضع ضمن أنابيب اختبار كمية 18 مل من المستخلص المائي لكل عزلة على حدة أُضيف لها كمية 2 مل من المعلق البوغي للفطر المدروس *Fusarium oxysporum* (بحيث وجب تحضيره بكثافة 4×10^6 بوغة/ مل في يوم الاستخلاص من مستعمرات بعمر سبعة أيام بالطريق نفسها التي حضرت بها المعلقات البوغية لعزلات الفطور *Trichoderma* sp. و *Aspergillus niger*).

5) تركت الأنابيب في الحاضنة على حرارة 23 ± 0.5 سْ لمدة 24 ساعة، ثم حسبت نسبة الإنتاش بالاستعانة بالشرائح ذات الحجرات المقعرة قياساً بالشاهد المحضر بإضافة 2 مل من المعلق البوغي للفيوزاريوم إلى 18 مل ماء مقطر معقم.

6) كُررت العملية (أي إضافة أبواغ الفطر فيوزاريوم إلى مستخلصات عزلات الفطرين تريكودرما وأسبرجلوس) بعد 3 و 9 أيام من بداية التحضين.

النتائج والمناقشة:*

1). نتائج تأثير الفطور في نمو ميسليوم الفطر فيوزاريوم:

يبين الجدول (1) النتائج التي تم الحصول عليها بعد 3 ، 6 ، 2 يوم من زراعة الفيوزاريوم في الطبق في المعاملات: الفطر فيوزاريوم **مع**، الفطر فيوزاريوم **قبل**، الفطر فيوزاريوم **بعد** العامل الأحيائي الفطري على التوالي، حيث أخذت هذه القراءات في اليوم الأخير للتجربة في كل من النماذج الثلاثة (أي الفيوزاريوم مع العامل الأحيائي، والفيوزاريوم قبل العامل الأحيائي، والفيوزاريوم بعد العامل الأحيائي) وهو اليوم الذي حدث فيه تماس بين مستعمرة أحد العوامل الأحيائية ومستعمرة الفطر فيوزاريوم في الطبق.

جدول (1): تأثير العوامل الأحيائية المختبرة في متوسط نصف قطر مستعمرة عزلة الفيوزاريوم.

المعاملة	متوسط نصف قطر مستعمرة الفيوزاريوم (ملم)*					
	الشاهد	T1	T2	T3	As1	Lsd
الفيوزاريوم مع العامل الأحيائي	8.75 a	5.88 b	5.00b	5.75 b	8.25 a	1.195
الفيوزاريوم قبل العامل الأحيائي	16.63 a	13.00 b	13.00 b	13.5 b	16.00 a	2.956
الفيوزاريوم بعد العامل الأحيائي	7.75 a	2.55 c	5.88 b	6.13 b	5.50 b	1.279

*أخذَت هذه القراءات بعد 3 أيام لمعاملة الفيوزاريوم مع العامل الأحيائي، وبعد 6 أيام لمعاملة الفيوزاريوم قبل العامل الأحيائي، وبعد يومين لمعاملة الفيوزاريوم بعد العامل الأحيائي.

كما يبين الجدول (2) نسبة النمو المصححة بالمقارنة مع الشاهد بعد زراعة الفيوزاريوم في الطبق في المعاملات الفطر فيوزاريوم مع، الفطر فيوزاريوم قبل، الفطر فيوزاريوم بعد العامل الأحيائي الفطري على التوالي.

جدول (2): نسبة النمو المصححة لعزلة الفيوزاريوم بتأثير العوامل الأحيائية بعد زراعة الفيوزاريوم في الطبق.

المعاملة	T1	T2	T3	As1
الفيوزاريوم مع العامل الأحيائي	67.2	57.1	65.7	94.3
الفيوزاريوم قبل العامل الاحيائي	78.2	78.2	81.2	96.2
الفيوزاريوم بعد العامل الأحيائي	32.9	75.9	79.1	71.0

يتضح من الجدولين السابقين أنه:

أ). عند تطبيق الفيوزاريوم مع العامل الأحيائي أو عند تطبيقه قبل العامل الأحيائي بـ 48 ساعة لم تظهر فروق معنوية بين عزلات الفطر تريكودرما فيما بينها (من حيث التأثير في متوسط نمو ميسليوم الفطر فيوزاريوم)، ولكن ظهرت فروق معنوية بين الشاهد والعزلات الثلاثة حيث كانت العزلة المحلية T2 أكثر العزلات منعاً إذ بلغت نسبة منع النمو المصححة 42.9 %، ولم تلاحَظ فروق معنوية في متوسط نمو ميسليوم الفطر فيوزاريوم في معاملة الشاهد ومعاملة تطبيق الفيوزاريوم مع الفطر أسبرجلوس، في حين تفوقت عزلات الفطر تريكودرما بفروق معنوية على عزلة الفطر أسبرجلوس في منع نمو ميسليوم الفطر فيوزاريوم، وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه بعض الباحثين من حيث تأثير عزلات الفطر تريكودرما في نمو الخيوط الفطرية للفطر فيوزاريوم (Özer *et al.,* 2009) لكنها لاتتفق مع ما توصلو إليه من حيث تأثير الفطر أسبرجلوس في نمو الخيوط الفطرية للفطر فيوزاريوم وربما يعود ذلك إلى الاختلاف في الشكل النوعي للفطر فيوزاريوم المعتمد في كل من البحثين (Özer *et al.,* 2009). ويشير الجدول (2) إلى أن تأثير العامل الحيوي كان أفضل عند تطبيقه مع الفطر الممرض في الوقت ذاته حيث تراوحت نسبة منع النمو بين 32.8 – 42.9 %، في حين تراوحت بين 18.8 – 21.8 % عند زراعة الفيوزاريوم قبل العامل الأحيائي بـ 48 ساعة وهذا لايتفق مع نتائج الفريق آنف الذكر من الباحثين (Özer *et al.,* 2009) الذين أشاروا إلى عدم وجود فروق في تأثير عزلات الفطر تريكودرما وعزلات الفطر أسبرجلوس على الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* المسبب لمرض عفن القاعدة في البصل سواء تم حقنهما قبل أو مع الفطر فيوزاريوم.

ب). أما عند تطبيق الفيوزاريوم بعد العامل الأحيائي بـ 48 ساعة فقد كانت النتائج أكثر وضوحاً حيث بلغت نسبة منع النمو المصححة للفطر فيوزاريوم 20.9 – 67.1%. حيث تفوقت العزلة التجارية T1 معنوياً على باقي العزلات التي تفوقت بدورها معنوياً في خفض متوسط نمو ميسليوم الفطر فيوزاريوم على معاملة الشاهد، ولم تلاحظ فروق معنوية في متوسط نمو ميسليوم هذا الفطر بتأثير العزلات T2 ، T3 ، As1.

***2). نتائج التأثير في سرعة تشكل أبواغ الفطر فيوزاريوم:**

يبين الجدول (3) نتائج اختبار تأثير العوامل الأحيائية في سرعة تشكل أبواغ الفطر بعد ثلاثة أيام من زراعة الفطر فيوزاريوم.

جدول (3): تأثير العوامل الأحيائية المختبرة على كثافة وسرعة تشكل أبواغ عزلة الفطر فيوزاريوم بعد ثلاثة أيام من الزراعة.

المعاملة	كثافة الأبواغ		سرعة تشكل الأبواغ	
	ك م(بوغة/ملم^2)	ك م %	سر(بوغة/يوم/مستعمرة)	سر %
الشاهد	29.4×10^3	-	62.14×10^5	_

T2 + F3	10×23.4^{3}	79.6	10×22.86^{5}	36.8
T3 + F3	10×11.0^{3}	37.4	10×12.32^{5}	19.8
T1 + F3	10×22.1^{3}	75.2	10×15.89^{5}	25.6
As1 + F3	10×22.6^{3}	76.9	10×22.95^{5}	36.9

تشير النتائج في الجدول السابق إلى أن أقل سرعة لتشكل أبواغ الفطر فيوزاريوم مقارنة مع الشاهد كانت بتأثير العزلة المحلية T3 في حين كانت السرعة الأكبر بتأثير العزلة As1 ثم T2 رغم أن كثافة الأبواغ كانت أكبر بتأثير العزلة المحلية T2 وهذا يتوافق مع ماورد في تأثير العوامل الأحيائية في نمو ميسليوم الفطر فيوزاريوم حيث كانت نسبة نمو الخيوط الفطرية أصغر ماتكون بتأثير العزلة المحلية T2 وهذا مايفرضه المنطق عند التفكير في آليات حفاظ الكائن الحي الفطري على استمراريته مما يقودنا إلى القول : إن هناك تناسباً عكسياً بين نمو الميسليوم وسرعة تشكل الأبواغ.

***3). نتائج تأثير العوامل الأحيائية في إنتاش أبواغ الفطر فيوزاريوم:**

يوضح الجدول (4) نسب إنتاش أبواغ الفطر *Fusarium oxysporum* تحت تأثير المستخلصات المائية لعزلات الفطرين تريكودرما والأسبرجيلوس (حيث تم الاستخلاص بعد يوم واحد، ثلاثة أيام، تسعة أيام من بداية تحضين المعلق البوغي على حرارة 23 ± 0.5 سْ في الظلام).

جدول (4): النسبة المئوية لإنتاش أبواغ الفيوزاريوم تحت تأثير المستخلصات المائية لعزلات الفطرين تريكودرما وأسبرجلوس المستخلصة بعد 1، 3، 9 أيام من بداية التحضين.

المعاملة	متوسط النسبة المئوية للإنتاش %		
	بعد 1 يوم	بعد 3 أيام	بعد 9 أيام
الشاهد	94.4 a	100.0 a	93.6 a
T1	91.2 a	94.0 b	81.7 b
T2	90.6 a	95.0 b	27.2 c
T3	92.3 a	98.0 a	81.3 b
As1	92.4 a	98.7 a	32.6 c
l.s.d.	6.634	3.341	8.513

تبين النتائج عدم وجود فروق معنوية في النسبة المئوية لإنتاش أبواغ الفيوزاريوم بين الشاهد والمعاملات عند الاستخلاص بعد يوم واحد من التحضين مما يشير إلى عدم تأثير المستخلصات المائية للعزلات الفطرية المدروسة في إنتاش أبواغ الفيوزاريوم في حال تم الحصول على هذه المستخلصات بعد يوم واحد من التحضين.

لكن عندما يتم الاستخلاص بعد ثلاثة أيام من بداية التحضين نلاحظ أنه لا يوجد فروق معنوية بين متوسطات الشاهد والفطر أسبرجلوس وعزلة التريكودرما T3 كما لاتوجد فروق معنوية بين متوسطات العزلتين T1 و T2 في حين تفوق الإنتاش في الشاهد والعزلتين T3، As1 على العزلتين T1 و T2 من جهة ثانية وبفروق معنوية، ويعزى هذا التأثير للمستخلصات المائية للعزلتين T1 و T2 في إنتاش أبواغ الفطر فيوزاريوم إلى احتوائها على مركبات كيميائية أنتجها ميسليوم تلك العزلات وليس الأبواغ نظراً لأن التأثير لم يظهر عند الاستخلاص بعد يوم واحد من تحضير

المعلق البوغي إذ كان الميسليوم في بداية تشكله وتطوره، وبما أن المعلق البوغي للعزلة الفطرية أعيد إلى الحاضنة نفسها على الحرارة نفسها بعد الاستخلاص الأول فإن المتغير الوحيد في ذلك المعلق البوغي خلال اليومين التاليين للاستخلاص الأول هو إنبات الأبواغ الموجودة فيه وتطور الميسليوم ونشاطه الحيوي الكيميائي وهذا ماأكده العديد من الباحثين في مجال المكافحة الأحيائية لممرضات النبات الفطرية باستخدام الفطور (Mondal *et al.*,1999; Özer *et al.,* 2009; Dwivedi and Enespa,2013) ونظراً لأن الاستخلاص تم باستخدام مرشحات عالية الدقة قطر ثقوبها أقل من قطر أبواغ العزلات الفطرية المعتمدة فإن المستخلصات المائية لاتحوي أية أجزاء فطرية وإنما تحتوي فقط على مفرزات ونواتج استقلاب تلك العزلات الفطرية، أما عن عدم تأثير العزلتين T3 ، As1 بعد ثلاثة أيام من التحضين فإما بسبب عدم وجود تأثير سلبي لمنتجاتهما الكيميائية على أبواغ عزلة الفطر فيوزاريوم المعتمدة في البحث، أو لأن كمية هذه المنتجات المتكونة خلال ثلاثة أيام لم تكن كفيلة بإحداث التأثير الجلي.

أما عند الاستخلاص بعد تسعة أيام من بداية التحضين فيتضح من النتائج أنه لايوجد فروق معنوية بين متوسطات (الأسبرجلوس و عزلة التريكودرما T2) كما لا يوجد فروق معنوية بين متوسطات عزلتي التريكودرما (T1 و T3) في حين توجد فروق معنوية بين متوسطات الشاهد وكل من المجموعتين السابقتين كما توجد فروق معنوية بين متوسطات المجموعتين السابقتين حيث تفوقت عناصر المجموعة الأولى (As1، T2) على عناصر المجموعة الثانية (T1 و T3) في منع إنتاش أبواغ عزلة الفيوزاريوم بعد 9 أيام من التحضين، ويعزى هذا التأثير للمستخلصات المائية للعزلات الأربعة في إنتاش أبواغ الفطر فيوزاريوم إلى محتواها من المركبات الكيميائية المنتجة من قبل ميسليوم تلك العزلات، وبما أن المعلق البوغي للعزلة الفطرية أعيد إلى الحاضنة نفسها على الحرارة نفسها بعد الاستخلاص الثاني فقد طرأ تطور في نمو ميسليوم هذه العزلات ونشاطه الكيموحيوي مما أدى إلى زيادة كمية المركبات الكيميائية المتكونة في وسط المعلق الفطري للعزلتين As1 و T3 اللتين لم تبديا تأثيراً يذكر في الاستخلاصين السابقين.

بمقارنة النتائج السابقة يتضح تأخر ظهور تأثير عزلة الفطر أسبرجيلوس في منع إنتاش أبواغ الفطر *Fusarium oxysporum* حتى اليوم التاسع من التجربة مقارنة مع عزلات الفطر تريكودرما الأمر الذي دفعنا لمقارنة سرعة نمو العزلات الأربعة (T1 ، T2 ، T3 ، As1) على بيئة البطاطا والدكستروز آغار لتبيان سبب تأخر ظهور تأثير عزلة الفطر أسبرجيلوس ويوضح الجدول (5) مقارنة متوسطات أقطار مستعمرات عزلات الفطرين تريكودرما وأسبرجيلوس مقاسة بالـ (ملم) بعد يومين من التحضين.

جدول (5): متوسطات أقطار مستعمرات عزلات الفطرين تريكودرما وأسبرجيلوس بعد يومين من التحضين.

العزلة الفطرية	متوسط قطر المستعمرة (ملم)
T1	72.0
T2	61.0
T3	55.0
As1	21.8

تشير هذه النتائج إلى أن سرعة نمو ميسليوم عزلة الفطر أسبرجلوس أبطأ من سرعة نمو ميسليوم عزلات الفطر تريكودرما.

الاستنتاجلت والتوصيات:

الاستنتاجات:

1) تفوقت العزلات المحلية للفطر تريكودرما T2، T3 على عزلة الفطر أسبرجلوس As1 في تثبيط نمو ميسليوم الفطر فيوزاريوم عندما طبقت تلك العوامل الأحيائية مع الفطر فيوزاريوم وبعده بـ 48 ساعة، ولم تلاحظ فروق معنوية بين العزلة التجارية للفطر تريكودرما T1 والعزلتين المحليتين T2، T3 بالتثبيط في نموذجي التطبيق آنفي الذكر.

2) لم تلاحظ فروق معنوية في تثبيط نمو ميسليوم الفطر فيوزاريوم بتأثير العزلات المحلية الثلاثة T2، T3، As1 وذلك عندما زرعت تلك العوامل الأحيائية قبل الفطر فيوزاريوم بـ 48 ساعة، في حين تفوقت العزلة التجارية في نموذج الزراعة هذا على العزلات المحلية في تثبيط نمو ميسليوم الفطر فيوزاريوم.

3) أبدت عزلات العوامل الأحيائية الأربعة تأثيراً سلبياً في سرعة تشكل أبواغ الفطر فيوزاريوم ولوحظ التناسب العكسي بين سرعة تشكل الأبواغ ومتوسط نمو ميسليوم الفطر فيوزاريوم بتأثير تلك العزلات.

4) إن عزلات العوامل الأحيائية المدروسة تفرز مركبات تؤثر في إنتاش أبواغ عزلة الفطر *Fusarium oxysporum*.

5) يزداد إفراز هذه المركبات الكيميائية مع الزمن لكل من العوامل الأحيائية المدروسة بدليل عدم التأثير المعنوي للرشاحة خلال الـ 24 ساعة الأولى من تحضين المعلقات البوغية الخاصة بهذه العزلات.

6) تأخر ظهور تأثير الأسبرجيلوس في إنتاش أبواغ الفطر فيوزاريوم حتى اليوم التاسع من بداية التحضين يعود إلى تفوق عزلات التريكودرما في سرعة نموها على عزلة الأسبرجلوس المعتمدة في التجربة حيث تم التأكد من ذلك من خلال مقارنة نمو الخيوط الفطرية على مستبت الـ PDA .

التوصيات:

1. يستحسن إجراء دراسة مخبرية للمركبات الكيميائية التي تفرزها العزلات المدروسة التي أدت إلى تثبيط إنتاش أبواغ الفطر *Fusarium oxysporum* وذلك باعتماد طرائق التحليل الكروماتوغرافي.

2. إجراء تجارب حقلية للتأكد من التأثير الإيجابي للفطر *Aspergillus niger* وعزلات الفطر تريكودرما في المكافحة الحيوية للفطر الممرض *Fusarium oxysporum*.

المراجع:

1. طويل ، محمد زكريا؛ صباح المغربي؛ عماد بلال؛ ووطفة الإبراهيم. دراسة ظاهرة جفاف أشجار التفاح في الساحل السوري ومكافحتها. التقرير النهائي، 2003، 178 صفحة.

1). AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. 5th edition, Academic press, Inc : San Diego, 2005, 803.

2). Dwivedi, S.K. and Enespa. *In vitro* efficacy of some fungal antagonists against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing brinjal and tomato wilt. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, India,4(1), 2013, 46-52.

3). MAROIS, J. J., and MITCHELL, D. J. *Effects of fumigation and fungal antagonists on the relationships of inoculum density to infection incidence and disease severity in Fusarium crown rot of tomato*. *Phytopahology*, 71,1981, 167–170.

4). MONDAL,G.; DUREJA,P.;SEN, B.*Fungal metabolites from Aspergillus niger AN27 related to plant growth promotion*. Indian Journal of Experimental Biology, vol.38,January 2000, 84-87.

5). NELSON, P. E., TOUSSOUN, T. A. and COOK, R. J.. *Fusarium : Disease, Biology and taxonomy*. The Pennsylvania State University press : university park, Pennsylvania, 1981(Eds.), 457.

6). ÖZER,N.; KOÇ, M.; DER, B. The Sensitivity of *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* to Fungistasis in Onion-Growing Soils.). Journal of Plant Pathology, 91 (2),2009,401-410.

7). SMITH, I. M.; DUNEZ, J; PILLIPS, D. H.; LELLIOTT, R. A.; ARCHER, S. A. *European handbook of plant diseases.* Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1988 (eds.), 583pp.

8). SUNDAR, A.R.; DAS, N.D.; KRISHNAVENI, D. *In-vitro antagonism* of *Trichoderma* spp. *against two fungal pathogens of Castor*. Indian J Plant Protec 23, 1995, 152-155.

9). SUNIL, C.; DUBEY,M.; SURESH, B. S. *Evaluation of Trichoderma species against Fusarium oxysporum f. sp. ciceris for integrated management of chickpea wilt*. Biological Control. Volume 40, Issue 1, January 2007, Pages 118-127.

10). TAWIL, M. *Synthése et Tests Biologiques (Correlation Structeur-Activité) de Composes Heterocyclique Susceptibles de Presenter une Activité Anti-fongique*. Thése Docteur ES Science presenté a l' université D' Aix-Marseille III (France). 1985.

11). WATANABE, T. *Fungi isolated from the underground parts of sugarcane in relation to the poor ratooning in Taiwan*. Trans. Mycol. Soc. Jpn. 16:264–267. 1975. Cited in: WATANABE, T. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi* : Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. 2nd edition.506. 2002.