مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (40) العدد (3) 2018
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (40) No. (3) 2018

Influence of *Trichoderma harzianum* on The Infection of Tobacco (Burley Variety) by Black Shank Disease *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*

Dr. Mahmoud Hasan[1]
Dr. Ramez Mohammad[2]
Tarek Hasan[3]

(Received 17 / 12 / 2017. Accepted 20 / 5 /2018)

□ ABSTRACT □

To Study the influence of fungus *Trichoderma harzianum* against the fungus *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* the causal agent of tobacco black shank disease in the laboratory and the field. We found the inhibition growth percent of *P. parasitica* var *nicotianae* by *T.harzianum* by 58.42% , in the field the infection percent of tobacco burley plant which treated with *T. harzianum* was decreased to 18.8% by the spray method, and 50% by the irrigation method comparing with the control which infected by *P. parasitica*. var *nicotianae* was 53.3%, and decreased the infection severity to 59.1% and 73.3% respectively for treated plants by *T. harzianum* by spray and irrigation method comparing by the infection severity of control which was 50.8%. The concentration of Free Salicylic Acid in treated plant by both fungi was 104 and 106.3 ppm in the plants which treated by *T. harzianum* by spray and irrigation method respectively, and 62 ppm to the control which treated by *P.p* var *nicotianae*. And the Peroxidase activity reached to 1.08 and 1.16 respectively nanomol in the treated plants by *T.harzianum* by spray and irrigation method sequentially comparing by 0.68 nanomol in the control which treated by *P.p* var *nicotianae*. So we noticed the positive role of *T.harzianum* by decreased percent and severity infection of black shank disease , we refer this to its role in stimulate the Aquired Systemic Resistance by measured free salicylic acid and Peroxidase activity in treated plants.

Key Words: Aquired Systemic Resistance, *Trichoderma harzianum*, *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* , Tobacco Plant.

[1] **Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia - SYRIA**
[2] **Assistant Professor, Department of Nutritive Science, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia - SYRIA.**
[3] **. Doctorate Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia – SYRIA**. thhshs80@hotmail.com

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (40) العدد (3) 2018
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (40) No. (3) 2018

تأثير الفطر *Trichoderma harzianum* في إصابة نبات التبغ (صنف البرلي) بمرض الساق الأسود الناتج عن الفطر *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*

د. محمود حسن[1]
د. رامز محمد[2]
طارق حسن[3]

(تاريخ الإيداع 17 / 12 / 2017. قبل للنشر في 20 / 5 / 2018)

□ ملخّص □

تمَّ دراسة تأثير الفطر *Trichoderma harzianum* ضد الفطر المسبب لمرض الساق الأسود *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* مخبرياً وحقلياً. ,وجد أن نسبة منع فطر *T. harzianum* للفطر الممرض *P. parasitica* var. *nicotianae* مخبرياً 58.42 %. أما حقلياً فخفض من نسبة إصابة نباتات التبغ البرلي المعاملة بفطر *T. harzianum* بطريقة الرش إلى 18.8 % و50% بطريقة الري مقارنة بالشاهد المعدى بالفطر *P.p* var. *nicotianae* الذي وصلت فيه نسبة الإصابة إلى 53.3% ، وخفض من شدة الإصابة إلى 59.1% للنباتات المعداة بالفطر*T. harzianum* بطريقة الرش و 73.8% بطريقة الري مقارنة بالشاهد المعدى بالفطر الممرض الذي وصلت فيه شدة الإصابة إلى 50.8%. وبتحليل كمية حمض الساليسيليك الحر الموجود في النباتات المعاملة بكلا الفطرين وجدنا ارتفاع في تركيز حمض الساليسيليك الحر إذ وصل إلى 104و 106.3 PPM في النباتات المعاملة بالفطر*T. harzianum* بطريقة الرش والري على التوالي، مقارنة ب 62 PPM للشاهد المعدى بالفطر الممرض.كما وجدنا ارتفاع في مستوى نشاط إنزيم البيروكسيداز وصل إلى 1.08 و 1.16 نانو مول في النباتات المعاملة بالفطر *T. harzianum* بطريقتي الرش والري على التوالي مقارنة ب 0.68 نانو مول في النباتات المعداة بالفطر الممرض. وهنا نلاحظ الدور الايجابي للفطر *T. harzianum* في تخفيض نسبة وشدة الإصابة بمرض الساق الأسود ويمكن أن يعزى دوره في تحفيز المقاومة الجهازية المكتسبة من خلال قياس حمض الساليسيليك الحر وإنزيم البيروكسيداز في النباتات المعاملة.

الكلمات المفتاحية: مقاومة جهازية مكتسبة ، *Trichoderma harzianum* ، *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, ، نبات التبغ.

[1] أستاذ ، قسم وقاية النبات ، كلية الزراعة ، جامعة تشرين ، اللاذقية، سورية.
[2] أستاذ مساعد ، قسم علوم الأغذية ، كلية الزراعة ، جامعة تشرين ، اللاذقية، سورية.
[3] طالب دراسات عليا(دكتوراه) قسم وقاية النبات ، كلية الزراعة ، جامعة تشرين ، اللاذقية، سورية thhshs80@hotmail.com

مقدمة:

يُعد التبغ من المحاصيل الاقتصادية والصناعية الهامة في سورية كونه يؤمن جزءاً من القطع الأجنبي لدعم ميزانية الدولة، وعمل آلاف العاملين بهذا المجال من زراعته وحتى تسويقه. يعتبر التبغ البرلي من أهم الأصناف المزروعة في سوريا والعالم، إذ يستخدم في صنع السجائر، ويشارك بنسبة 33% في خلطة السجائر الأمريكية، إضافة إلى الفرجينيا والتبوغ الشرقية. ويمتاز البرلي بقدرته على امتصاص السوائل والمنكهات (مواد التعسيل)، التي تبلغ خمسة أضعاف ما يمتصه التبغ الشرقي، كما يتمتع بقدرة عالية على اللف، والمردود العالي في التصنيع والقابلية الجيدة للاشتعال.(Frederick, 1962).

يُعد مرض الساق الأسود من أهم الأمراض الفطرية التي تصيب محصول التبغ المتسبب عن الفطر *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (B.de Haan) Tucker إذ يصيب التبغ في المشاتل وفي الحقل، يستطيع المرض أن يصيب الشتول في أي مرحلة من مراحل نموها، إذ تؤدي إصابة الشتول به إلى تحللها بالقرب من سطح التربة وموتها، ويظهر المرض خلال الفترات الرطبة على شكل عفن رطب وتذبل قمة النبات في الجو الجاف وتتحول أوراقه إلى اللون الأصفر ثم البني وينتهي بموت النبات. أما في الحقل فأول ما تظهر أعراض الإصابة على النبات الكامل تكون على شكل ذبول مؤقت، يتطور إلى شحوب الأوراق، ومن ثم ذبول دائم، يظهر الفحص الدقيق للنبات وجود بقع سوداء على الساق، تمتد فوق سطح التربة، وتحلل واسوداد الجذور. وإذا أُحدث شقٌ طولي في ساق النبات المصاب فإنه يظهر بلون بني مسود لعدَّة سنتمترات فوق المنطقة المسودة من الخارج. كما يلاحظ جفاف نسيج اللب (خاصة عند قاعدة الساق) وتحولها إلى صفائح مما يسهل كسر الساق أثناء هبوب الرياح (Csion, 1999; Gallup *et al*., 2006). تسبَّبَ مرض الساق الأسود بخسائر سنوية مسجلة وصلت لأكثر من 10 مليون دولار في شمال كالورينا لوحدها (Mila and Radcliff, 2014). أما في ولاية جورجيا فقد سبب مرض الساق الأسود في 14–21 سنة الأخيرة خسائر تراوحت بين 0.1–2% (Bertrand , 2011)، وفي بعض مناطق زراعة التبغ في ولاية كارولينا الشمالية تراوحت الخسائر مابين 85– 100% (Gallup *et al*, 2006)

تتم إدارة مكافحة المرض من خلال تكامل الإجراءات الزراعية، والدورة الزراعية (فول الصويا، ذرة، برسيم..)، واستخدام المكافحة الكيميائية كاستخدام مشتقات الميتالاكسيل (Lucas,1975; Shew and Lucas ,1991; Mila and Radcliff, 2014; De Beer and Terblanche 2011) وقد أشار Bittner و Mila عام 2016 لفاعلية مبيد فطري جديد وهو Oxathiapiprolin ضد الفطور البيضية وذا فعالية عالية ضد مرض الساق الأسود في التبغ. وهو أول مبيد فطري يتبع مجموعة المبيدات الفطرية Piperidinyl Thiazol Isoxazolin (Ji *et al* 2014).

وفي الفترة الأخيرة ظهر توجُّه إلى تخفيض تطبيق المكافحة الكيماوية في وقاية النباتات واهتمام كبير نحو المكافحة الحيوية كبديل عن المبيدات الصناعية نتيجة للإزدياد الملحوظ في مستوى الأمان، والتأثيرات البيئية السلبية الأقل ما يمكن.ومن أكثر عوامل المكافحة الحيوية شهرة هو فطر *Trichoderma* spp والذي طور إلى منتجات مكافحة حيوية بشكل تجاري، تستخدم في الحقول والبيوت المحمية (Mudri and Sušinjak, 2000; Harman, 2000). ويعد فطر *Trichoderma* spp عامل مكافحة حيوية أقل كلفة في مكافحة الأمراض الجهازية المختلفة ، ليس له أي تأثيرات على الكائنات الحية المفيدة ولا على الإنسان والحياة البرية، آمن وفعال في كل من البيئات الطبيعية والمسيطر عليها، ولا يتراكم في السلسلة الغذائية، ويستطيع الانتشار في التربة أو أجزاء من النبات بسبب نموه السريع،

كما ينتج مضادات حيوية تستطيع قتل الممرضات، ويشجع على تطور النبات، ويحفز آليات دفاعية في النبات (Saba *et al* .2012; Prisa, 2011) لقدرته على تحفيز النمو وتحفيز المقاومة الجهازية في النبات (De Meyer *et al*.,1998) إذ إن تنشيط ردود الدفاع عند النباتات عن طريق زيادة النشاطات الأنزيمية يمكن أن تكون إستراتيجية بديلة عن النباتات المعدلة وراثياً للحماية ضد الممرضات، حيث ساهم وجود سلالات التريكوديرما المنتجة لأنزيمي Chitinase و Glucanase في زيادة مقاومة النباتات لفترات طويلة قد تستمر لعدة أشهر (Harman *et al*., 2004)

أظهرت أنواع *Trichoderma* spp تأثيراً كبيراً ضد الفطر *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Chen *et al* 2009) إذ وصلت نسبة المنع إلى 20.21%، كما يمكن للفطر *Trichoderma* spp أن ينتج مركبات طيارة كنواتج استقلابية ومواد مرتشحة لها تأثير كبير في منع نمو الفطر *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. وبيَّن Sivan و Chet عام 1989 قدرة فطر *Trichoderma spp* على إفراز إنزيم Glucanase -*β*-1,3 وChitinase إلى البيئة التي ينمو فيها .بالإضافة للإنزيمglucanases -1,6- *β* والتي تملك القدرة على الحد من نمو الفطر *Phytophthora* Sp والفطر *Pythium* Sp (Lorito *et al* ,1994; Thrane *et al* ,1997)

وبين Tashkoski عام 2013 قدرة الفطر *Trichoderma asperellum* على تخفيض نسبة نمو الفطر *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* إلى 67.86%.

كما بيِّن Singh و Islam عام 2010 القدرة العالية للفطر *Trichoderma harizianum* على منع نمو الفطر *Phytophthora nicotianae* . كما بين Hibar ورفاقه 2007 أثر *Trichoderma* spp في إحداث تغيرات بنيوية تتمثل بتشكيل موانع هيكلية وانسداد الفراغات بين الخلوية وزيادة في سماكة الجدر الخلوية أثناء معاملة نباتات البندورة بالفطر *Trichoderma harzianum* قبل إصابته بالفطر *Fusarium oxysporum*.

وقد وجد Ge ورفاقه 2001 أن *Trichoderma spp* استطاع أن يكافح *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* في البيوت الزجاجية بنسبة 97.6%، وفي الحقل بنسبة 67%. يمكن لعزلات من *Trichoderma spp* أن تكون قادرة على أن تغزو الأنسجة الوعائية أو خلايا البشرة لجذور النباتات مؤدية إلى ارتفاع وتراكم في جزيئات الإشارة كحمض الساليسيليك الحر **F**ree **S**alicylic **A**cid (FSA) وحمض الجاسمونيك JA تعمل هذه المركبات على تحريض تكوين مورثات متعلقة بالإمراضية (PR gene) تعمل على تشفير البروتينات المتعلقة بالإمراضية (**P**athogenesis- **R**elated **P**roteins) PR protein والتي تظهر على النبات لتدافع عنه ضد الإصابة بالممرض (Hurtado, 2004; Wasternack *et al*., 2006).

كما يمكن أن تترافق الحالة الدفاعية ضد الفطر *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* بنشاط للسمية الخلوية تنشأ من خلال تراكم لحمض الساليسيليك الحر (Hugot *et al*.,1999). ويمكن لأنزيم Peroxidase أن يكون مؤشراً لتحفيز عمليات الأكسدة المحرضة للمقاومة الجهازية المكتسبة التي تسمح للنبات بالرَّد بسرعة أكثر فاعلية للعدوى بالمسبب الممرض (Gozzo, 2003; Kuc, 2001; Benhamou and Picard, 1999; Schneider *et al* .,1996). وقد أكدَّ Moerschbacher ورفاقه 1988 أن المستويات العالية للبيروكسيداز الخلوية يمكن أن تلعب دوراً متمماً في زيادة سماكة جدر الخلية والتي بدورها تساعد في مقاومة النبات لاختراق الممرضات الفطرية

أهمية البحث وأهدافه:

إنَّ انتشار مرض الساق الأسود في الآونة الأخيرة، وازدياد المساحات المزروعة بمحصول التبغ البرلي والمصابة بهذا المرض، والأضرار التي ألحقها به، واستخدام المبيدات بشكل كبير لمكافحته، والأضرار البيئة الكبيرة الناتجة عن استخدامها، أدى للبحث عن حلول بديلة للمبيدات تكون آمنة على البيئة وذات فاعلية جيدة ضد الممرض فكان أحد هذه الحلول استخدام فطر *Trichoderma harzianum* من هنا هدف هذا البحث إلى:

دراسة استخدام فطر *Trichoderma harzianum* ضد مرض الساق الأسود في نبات التبغ البرلي مخبرياً وفي الحقل، وأثره في تحريض المقاومة الجهازية المكتسبة في صنف التبغ البرلي.

طرائق البحث ومواده:

مكان العمل:

– تمَّ القيام بعمليات عزل الفطر الممرض والاختبارات الحيوية للفطر الممرض مع الفطر الحيوي في مخبر تربية وإنتاج فطر التريكوديرما التابعة لمديرية زراعة طرطوس – دائرة الوقاية

– تمَّ إجراء التجارب الحقلية في مزرعة وادي الدالي التابعة لقرية سمريان منطقة الصفصافة – محافظة طرطوس وذلك للموسم الزراعي 2016

– تمَّ تحديد مستوى حمض الساليسيليك الحر وإنزيم البيروكسيداز في مخبر تربية وإنتاج فطر التريكوديرما ومخبر المعهد العالي للبحوث البحرية – جامعة تشرين

- عزل الفطر الممرض:

تم عزل المسبب الممرض من الشتول الصغيرة المصابة في المشاتل ومن النباتات المصابة في الحقل غسلت جيداً بالماء الجاري لإزالة الأتربة العالقة بها، ومن ثمَّ قطِّعت إلى أجزاء صغيرة 3–5 مم وعقمت خارجياً بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 5% لمدّة دقيقتين، بعدها غسلت بالماء المقطر والمعقم لمدة دقيقتين وجفَّفت على أوراق ترشيح. زرعت القطع في أطباق بتري حاوية على مستنبت الـ PDA وبمعدل 3 أطباق لكل عينة مصابة ومن ثم وضعت في كيس نايلون لتقليل التلوث قدر الإمكان. وحضِّنت الأطباق على حرارة 25±2 س° وفي الظلام.(Luo *et al* ,2005)

– وصف وتحديد المسبب الممرض وحفظه:

تمَّ وصف المستعمرات الفطرية، وأُجري الفحص المجهري لتحديد الفطر *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* المعزول بالمقارنة مع الدراسات المرجعية (Watanabe. 2002).

– قياس أبعاد أبواغ الفطر:

تمَّ قياس أبعاد مختلف التراكيب الفطرية للفطر *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* وذلك بوساطة عدسة ميكرومترية وضعت في أنبوبة العدسة العينية، بعد معايرتها بشريحة ميكرومترية، تمَّ قياس أبعاد التراكيب الفطرية للفطر *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* للتأكد من أنَّه الفطر المدروس بمقارنته مع الدراسات المرجعية. (Bedobletshekova, 1977) .

- العدوى الاصطناعية:

بعد الحصول على مستعمرات نقية من الفطر *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* والتي عُزلت من النباتات المعداة صناعياً بهذا الفطر (والتي طُبِقت عليها فرضية كوخ بعد عزل الفطر الممرض من نباتات مصابة بمرض الساق الأسود).

أُجريت عملية العدوى الاصطناعية بإضافة قرص قطر 1 سم من مستعمرة *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* في حفرة بالقرب من ساق النبات.(حسن وآخرون، Jaarsveld, *et al*, 2009 ; 2002)

- التجارب المخبرية:

تمَّ إجراء اختبارات تأثير فطر *Trichoderma harzianum* في نمو الفطر *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* إذ وضع كلٌّ منهما بشكل متقابل على بعد 1سم من طرف الطبق البتري. كما زرعت أطباق شاهد لكل فطر على حده وفقاً لطريقة Singh و Islam عام 2010 وتركت لمدة 7 أيام.

تم قياس قطر المستعمرات الفطرية كل 3 أيام حتى اليوم السابع وحسبت نسبة التثبيط التي يقوم بها الفطر تريكوديرما ضد الفطر الممرض وفق المعادلة:

النسبة المئوية لتثبيط النمو= $\frac{100\times(y-x)}{x}$

x= متوسط قطر مستعمرة الفطر الممرض (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) لوحده (الشاهد)

y= متوسط قطر مستعمرة الفطر الممرض (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) بوجود *Trichoderma harzianum*

- التجارب الحقلية:

تمَّ اختيار موقع الدراسة في مزرعة وادي الدالي التابعة لقرية سمريان منطقة الصفصافة محافظة طرطوس (ارتفاع عن سطح البحر 25 م)، جهزت الأرض بما تحتاجه من سماد عضوي ومعدني، تمَّ تشتيل شتول بعمر 60 يوماً ، بطول 12 سم وعدد الأوراق 6 أوراق والخالية من أية أعراض ظاهرية ممرضة، بتاريخ 5/15 / 2016 وفق تصميم القطع المنشقة– المنشقة /Split-Split- Design/ بثلاث مكررات، كل مكرر 10 نباتات (خدام، 2013).

- المعاملة بالفطر *Trichoderma harzianum*

تمت معاملة النباتات بالفطر بطريقتين الري والرش بتاريخ 2016/6/2 رشاً على المجموع الخضري بمعلق فطر *Trichoderma harzianum* (عزلة محلية حصل عليها من مخبر الأعداء الحيوية في اللاذقية وهي معتمدة في مخبر تربية وإنتاج فطر التريكوديرما بطرطوس) بمعدل 10 مل/ نبات، والري بإجراء سقاية كل نبات باستخدام 30 مل/ نبات من المعلق بتركيز (10^6 بوغة/مل) (Abraham, 2005 ; أبو عرقوب، 2002) (حُضر المعلق بحل طبق بتري حاوي على مستعمرة نقية من الفطر *Trichoderma harzianum* في 1 ليتر ماء مقطر تم ترشيحها عبر ورق ترشيح وبالتالي نكون قد حصلنا على مستخلص يحوي أبواغ الفطر، تم تخفيف المستخلص لحين الوصول للتركيز المطلوب)، وذلك قبل الإعداء بالفطر الممرض ب 3 أيام. تم معاملة الشاهد بالماء المقطر رشاً 10 مل وبطريقة الري للجذور بـ 30 مل.(عتيق وآخرون، 2013)

- العدوى بالفطر الممرض *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*:

تم إجراء العدوى بالفطر الممرض بعد المعاملة بفطر *Trichoderma harzianum* ب 72 ساعة وذلك بإضافة قرص من مستعمرة الفطر الممرض في حفرة بجانب الجذر وإعادة طمرها بالتراب ومن ثم الترطيب بالماء. (Tashkoski. 2013; Dimitrieski *et al*. 2013)

تم بعدها أخذ القراءات وذلك بعد 50 يوماً من إجراء العدوى بالفطر الممرض لمعرفة نسبة وشدة الإصابة، وأخذت عينات من أوراق الطابق الورقي الأوسط لتقدير مستوى تركيز حمض الساليسيليك الحر ونشاط إنزيم البيروكسيداز في النباتات الخاضعة للتجربة.

تمَّ تقييم نتائج التجارب الحقلية للإصابة بالفطر *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* وذلك من خلال حساب نسبة وشدّة الإصابة. حسبت نسبة الإصابة من خلال القانون:

$$\text{نسبة الإصابة (\%)} = \frac{\text{عدد النباتات المصابة} \times 100}{\text{عدد النباتات الكلي}}$$

أما شدة الإصابة فقد حسبت بطريقة (Matheron and Mircetich, 1985) باعتماد السلم الخماسي التالي كما يلي: 0: عدم وجود إصابة على الساق، 1 : تغطي الإصابة 25% كحد أقصى من محيط ساق النبات، 2: 26- 50% من محيط ساق النبات، 3: 51- 75% من محيط ساق النبات، 4: أكثر من 75% من محيط ساق النبات.

واعتماداً على هذا السلم حُسبت شدَّة الإصابة وفق القانون (Heshely , 1978):

$$\text{شدة الإصابة (\%)} = \frac{\text{مجموع}(\text{عدد النباتات في كل درجة} \times \text{قيمة الدرجة}) \times 100}{\text{عدد النباتات الكلية} \times \text{أعلى قيمة}}$$

- تقدير مستوى تركيز حمض الساليسيليك الحر في النبات:

تم أخذ 1غ عينة نباتية أوراق النبات (الطبقة الوسطى) ووضعت في جفنة بورسلان وأضيف لها 1 مل حمض كلور الماء Hcl (6 نظامي) مع 10 مل كلوروفورم ، سحقت العينة في هاون بورسلان ورشح المزيج في قمع الفصل ومن ثم نقل الناتج (عينة نباتية، حمض كلور الماء، كلوروفورم) إلى أنابيب اختبار مرقمة. بعدها أضيف 5 مل من كاشف كلور الحديدي $Fecl_3$. تم قراءة تركيز حمض الساليسيليك الحر (ppm) بعد قراءة الامتصاص في جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند طول موجة 540 نانومتر. (Maria *et al*., 2007)

- تقدير نشاط إنزيم البيروكسيداز Peroxidase (Po):

- سُحِق 1 غ من أوراق الطبقة الوسطى لنباتات التبغ المعاملة في 2 مل من المحلول الفوسفاتي المنظم (0.1 مول) حيث كان (pH=7.0) على حرارة 4 س˚. وضع المزيج في جهاز الطرد المركزي 16000 دورة/ دقيقة على حرارة 4 س˚ لمدة 15 دقيقة حيث تم استخدام المادة الطافية كمصدر للإنزيم. يُحضر مزيج التفاعل 1.5 مل من Pyrogallol (0.05 مول)، و0.5 مل من مستخلص الإنزيم، و0.5 مل من الماء الاكسجيني (1%). حضن مزيج التفاعل على حرارة الغرفة (28±2) س˚. تم قياس التغيرات في الامتصاص الضوئي عند 420 نانومتر كل 30 ثانية لمدة 3 دقائق. (Hammerschmidt *et al*.,1982)، وحسب نشاط إنزيم Peroxidase وفق لمعادلة (Sadasivam & Manickam,1988)

وذلك وفقاً للمعادلة:

$$\text{نشاط إنزيم البيروكسيداز (نانومول)} = \frac{B \times \text{معامل تخفيف العينة}}{\text{الوقت النهائي}(3\ \text{دقائق}) - \text{الوقت البدائي}(0.5\ \text{دقيقة}) \times \text{حجم العينة}(2\ \text{مل})}$$

حللت النتائج إحصائيا باستخدام برنامج Genstat -12 وتمت المقارنة بين المتوسطات عند اقل فرق معنوي LSD 5%.

النتائج والمناقشة :

- عزل الفطر الممرض:

تم عزل مستعمرة نقية ذات لون أبيض قطني المظهر، فحصت المستعمرة وبعدها تمَّ التعرف على مكونات الفطر، فكانت أبعاد الأبواغ البيضية مابين 11.3–26.7 µm، والأكياس الإسبورانجية 15.6–22.5 ×11.4–18.2 µm وهي متوافقة مع المعطيات المرجعية (Gallup *et al*., 2006; Watanabe. 2002). تمّ ذلك بالمقارنة مع المفاتيح التصنيفية المتعلقة بتصنيف هذا الفطر وبالاعتماد على فرضية كوخ تثبت أن الفطر المعزول هو الفطر *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*

- تأثير فطر *Trichoderma harzianum* في نمو الفطر *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*:

نلاحظ من الجدول (3) أن نسبة التثبيط وصلت بعد 7 أيام إلى 58.42% ،إذ غطى بعدها *Trichoderma harzianum* سطح مستعمرة الفطر *Phytophthora parasitica* var .*nicotianae* بشكل كامل مع ملاحظة تشكل منطقة فاصلة بين الفطرين هي عبارة عن منطقة تمَّ فيها تحلل ميسليوم الفطر الممرض *Phytophthora parasitica* var .*nicotianae* من قبل *Trichoderma harzianum* بواسطة إنزيماته الفعالة وهو متوافق مع ما ذكره Singh و Islam عام 2010

جدول (3) النسبة المئوية لتثبيط الفطر *Trichoderma harzianum* نمو الفطر الممرض *Phytophthora parasitica* var .*nicotianae*

اليوم	متوسط قطر مستعمرة *Phytophthora parasitica* var .*nicotianae* (cm) بوجود الفطر*Trichoderma harzianum*	متوسط قطر مستعمرة *Phytophthora parasitica* var .*nicotianae* (cm) لوحده (شاهد)	نسبة التثبيط %
3	2.6	4.5	42.22
5	3.3	6.9	52.17
7	3.7	8.9	58.42

النتائج الحقلية:

أدى استخدام فطر *Trichoderma harzianum* إلى تخفيض في نسبة وشدة الإصابة بالفطر الممرض إذ يتبين لنا من الجدول (4) أن الفطر *Trichoderma harzianum* قد خفض وبشكل معنوي من نسبة الإصابة بمرض الساق الأسود بنسبة وصلت حتى 50% (طريقة الري) وخفض معنوياً من شدتها بنسبة 73.8% بالمقارنة مع الشاهد.

جدول (4) تأثير استخدام الفطر *Trichoderma harzianum* في نسبة وشدة الاصابة بمرض الساق الأسودعلى االتبغ البرلي

المعاملة	نسبة الإصابة	شدة الإصابة %
شاهد معدى ب*Phyto*	53.3^{b}	50.8^{b}
معاملة ب *Tri* (ري) + *Phyto*	26.7^{a}	13.3^{a}
معاملة ب *Tri* (رش) + *Phyto*	43.3^{b}	20.8^{a}
LSD 5%	11.53	8.75

المعاملات ذات الاحرف المتشابهة لايوجد بينها فروق معنوية

بينما نجد أن المعاملة بطريقة الرش كانت أقل فاعلية من طريقة المعاملة بالري فخفضت نسبة الإصابة بشكل غير معنوي بنسبة وصلت إلى 18.8% وشدة الإصابة بشكل معنوي إلى 59.1 % بالمقارنة مع الشاهد. ويتبيَّن هنا مدى فاعلية استخدام فطر *Trichoderma harzianum* في خفض نسبة وشدة إصابة نباتات البرلي بمرض الساق الأسود وهو ما يتوافق مع (Chen *et al* 2009; Ge *et al* .2001).

– نتائج تقدير مستوى حمض الساليسيليك الحر في أوراق التبغ البرلي الخاضعة للتجربة:

لما كان حمض الساليسيليك الحر أحد الأدلة على رفع نشاط المقاومة الجهازية المكتسبة في النبات، وجَب علينا التحري عن تركيزه في نباتات التجربة، وكانت النتائج التالية موضحةً تركيزه فيها والمبيَّنة في الجدول (5):

جدول (5) تأثير استخدام فطر *Trichoderma harzianum* بطريقتي الري و الرش والفطر الممرض في تركيز حمض الساليسيليك الحر في نباتات التبغ البرلي:

العينة	شاهد (ماء مقطر)	شاهد Tri (ري)	شاهد Tri (رش)	معاملة ب Tri (ري) + phyto	معاملة ب Tri (رش) + phyto	شاهد معدى ب *Phyto*	Lsd 5%
تركيز حمض الساليسيليك الحر (PPM)	62^{a}	96.7^{b}	94.4^{b}	106.3^{c}	104^{c}	93^{b}	6.24

المعاملات ذات الأحرف المتشابهة لايوجد بينها فروق معنوية

نلاحظ من الجدول (5) ارتفاعاً معنوياً في تركيز حمض الساليسيليك الحر في النباتات المعاملة بالفطر *Trichoderma harzianum* لاسيما بطريقة الري وصلت إلى ppm106.3 يعزى ذلك للدور الهام الذي يلعبه الفطر في تحريض النبات على إرسال إشارات تعمل على تحريض إنتاج حمض الساليسيليك الحر الذي يعتبر أحد المؤشرات على زيادة المقاومة الجهازية المكتسبة في النبات المعامل به، يليها طريقة الرش ppm104 مع عدم وجود فروق معنوية بين المعاملتين مقارنة بالشاهد السليم ppm 62 ، وهذا يتوافق مع كل من (Hugot *et al*.,1999; De Meyer *et al*.,1998) كما يلاحظ أن الفطر الممرض *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* قد رفع مستوى المقاومة الجهازية المكتسبة من خلال رفعه لمستوى حمض الساليسيليك الحر الذي وصل إلى ppm 93 مقارنة مع الشاهد ppm 62 كرد فعل على العدوى بالفطر الممرض.

2- نتائج تقدير نشاط أنزيم البيروكسيداز في أوراق التبغ البرلي الخاضعة للتجربة:

انطلاقاً من أهمية إنزيم البيروكسيداز في زيادة مقاومة النبات الجهازية المكتسبة من خلال دوره في تكوين لجنين جدار خلايا النبات، فقد أظهرت نتائج تحديد نشاط إنزيم البيروكسيداز في نباتات التجربة ما يلي:

نلاحظ من الجدول (6) أن المعاملة بالفطر *Trichoderma harzianum* أدت إلى ارتفاع معنوي في مستوى نشاط إنزيم البيروكسيداز في النباتات المعاملة به 1.16 نانومول (10^{-9} مول) بطريقة الري مقارنة بالشاهد

جدول (6) تأثير استخدام فطر *Trichoderma harzianum* بطريقتي الري والرش والفطر الممرض في تركيز انزيم البيروكسيداز في نباتات التبغ البرلي الخاضعة للتجربة

العينة	شاهد (ماء مقطر)	شاهد Tri (ري)	شاهد Tri (رش)	معاملة ب Tri (ري) + phyto	معاملة ب Tri (رش) + phyto	شاهد معدى ب *Phyto*	LSD
تركيز إنزيم البيروكسيداز (نانومول)	0.68^{a}	1.07^{bc}	1.05^{b}	1.16^{c}	1.08^{bc}	1.04^{b}	0.11

المعاملات ذات الاحرف المتشابهة لايوجد بينها فروق معنوية

0.68 نانومول، وهذا ما يتوافق مع (Gozzo, 2003; Kuc, 2001; Benhamou and Picard, 1999; Schneider *et al* .,1996). كما يمكن ملاحظة دور الفطر الممرض *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* في رفع مستوى نشاط إنزيم البيروكسيداز قليلاً كرد فعل على الإصابة بالفطر الممرض.

الاستنتاجات والتوصيات:

1- قدرة الفطر *Trichoderma harzianum* على تخفيض نسبة وشدة الإصابة بمرض الساق الأسود على نباتات التبغ البرلي لاسيما طريقة الري.

2- أدى استخدام *Trichoderma harzianum* إلى زيادة مستوى تركيز حمض الساليسيليك الحر ومستوى نشاط إنزيم البيروكسيداز.

3- ينصح باستخدام الفطر *Trichoderma harzianum* بطريقة الري لفاعليته في خفض نسبة وشدة الإصابة بمرض الساق الأسود.

المراجع:

1. أبو عرقوب؛ محمود موسى. *المضادات الحيوية والمقاومات الثلاثة (مكتسبة – مستحثة – حيوية) ودورها في أمراض النبات*. المكتبة الأكاديمية. 2002. 714 ص

2. حسن. محمود؛ عصام علاف وطارق حسن. *دراسة مرض الساق الأسود في حقول التبغ البلدي في محافظة طرطوس*. مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية- سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (31) العدد (4) 2009 . 235-223.

3. خدام ، مازن: *مساهمة في إيجاد بعض وسائل الوقاية من الإصابة بفيروس واي البطاطا على صنفي التبغ برلي وفرجينيا في سورية*. رسالة دكتوراه – جامعة تشرين .كلية الزراعة. قسم وقاية النبات. 2013. 140 ص.

4. عتيق، عمر؛ أحمد الأحمد؛ محمد أبو شعر؛ محمد موفق يبرق ومصطفى خطيب. *تحريض المقاومة الجهازية المكتسبة في نبات البندورة/الطماطم إزاء الأمراض التي تحدثها بعض الأنواع من الفطر Alternaria* . مجلة وقاية النبات العربية ، 31 (2)، 2013 ، 168– 176.

المراجع الأجنبية:

1. ABRAHAM. A. D.. *Biological Control Of Phytophthora Root Rot of Citrus Seedlings and Cuttings*. Master Thesis. University of Kwazulu- Natal Pietermaritzburg. 2005. PP. 126pp.

2. BEDOBLETSHEKOVA, N. M. *Classification fungi* .T 1.2.3. Keav Donka 1977.(Russian Language) .

3. BENHAMOU. N and PICARD. K. *La résistance induite: une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes*. Phytoprotection. 80: 1999. 137-168.

4. BERTRAND. P. F. *Disease Loss In Georgia Grown Tobacco* . CORESTA. Abstract. Agro/Phyto- Santiago de Chile. PP0ST 01. 2011.

5. BITTNER. R. J; MILA. A. L. *Effects of Oxathiapiprolin on Phytophthora Nicotianae, the Causal Agent of Black Shank of Tobacco*. Crop Protection 81: 2016. 57-64.

6. CHEN. ZHI-MIN; GU GANG; CHEN SHUN-HUI; ZHANG SHAO- SHENG. *Antagonism of Trichoderma spp. to Phytophthora parasitica var. nicotianae.* Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition) 03. 2009.

7. CSION, A.S. *Stem and Root Resistance to Tobacco Black Shank*. Plant disease, Vo 83, No 8, 1999, Pages. 777-780

8. DE BEER. M. C., TERBLANCHE. J. *Black Shank Resistance in Air- Cured Tobacco – South Africa*. CORESTA. Abstracts- Agro/ Phyto – Santiago De Chile. 2011.

9. DE MEYER. G; BIGIRIMANA. J; ELAD. Y; AND HOFTE. M. *Induced systemic resistance in Trichoderma harzianum T39 biocontrol of Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant Pathol. 104: 1998. 279-286.

10. DIMITRIESKI. M; MICESKA. G; KORUBIN. A; ALEKSOSKA. *Productional Characteristics of Some Oriental Tobacco Lines Resistant to Black Shank (Phytophthora Parasitica var Nicotianae)*. Tytyh/Tobacco,Vol.63, 2013. N°7-12. 1-7,

11. FREDERICK, A, W. *Aromatic and Oriental tobacco*. Duke University, North Carolina, 1962, p 352.

12. GALLUP, C. A; M. J. SULLIVAN, and H. D. SHEV. *Black shank of tobacco*. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I2006-0717-01. 2006. 7 pages

13. GE. W; SONG. L; YONHGKAI. M; YINGQI. W; WEIMING. Z; ZHENGGUO. L. *Study on the antagonistic mechanism of Trichoderma sp. For Phytophthora nicotianae and it's biocontrol effect*. CORESTA Meet. Agro-Phyto Groups, Cape Town, abstr. PPOST7. 2001.

14. GOZZO F. *Systemic resistance in crop protection: from nature to a chemical approach*. J Agric Food Chem. 51: 2003 .4487-4503.

15. HAMMERSCHMIDT. R; NUCKLES. E. M AND KUC. J. *Association of enhanced Peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to Colletotrichum lagenarium* Physiol. Pl. Pathol. 20, 1982. 73-82.

16. HARMAN. *Myths and dogmas of biocontrol changes in perception derived from research on Trichoderma harezianum strain T-22. Plant* Disease Report.84(4): 2000 .377-393

17. HARMAN. G. E; HOWELL. C. R; VITERBO. A; CHET. I; and LORITO. M. *Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts*. Nature Reviews, 2: 2004. 43-56.

18. HIBAR, K; DAAMI-REMADI, M; AND EL MAHJOUB, M. *Induction of Resistance in Tomato Plants Against Fusarium Oxysporium f.sp radicis- lycopersici by Trichoderma spp* . Tunisian Journal of Plant Protection. 2007. 2:47-58.

19. HUGOT. K; AIME. S; CONROD. S, POUPET. A; GALIANA. E. *Developmentals regulated Mechanisms affect the ability of a fungal pathogen to infect and colonize tobacco leaves. Plant* J; 1999: 20:163-170.

20. HURTADO. O. *Study and Manipulation of The Salicylic Acid- Dependent Defense Pathway in Plants Parasitized by Orobanche aegyptianca pers. Master of sciences thesis . Plant Physiology, Viriginia*. Polytechnic Institute and State University. USA . 2004.

21. JAARSVLD, VAN E; WINGFIELD. M. J; DRENTH. A. *Evaluation of Tobacco Cultivars for Resistance to Races of Phytophthora nicotianae in South Africa* .J. Phytopathology 150. 2002. 456–462

22. JI. P; CSINOS. A. S; HICKMAN. L. L. *Efficacy and Application Methods of Oxathiapipolin For Management of Black Shank on Tobacco*. Plant Dis. 98, 2014. 1551-1554.

23. KUE. J. *Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application.* Eur J Plant Pathol. 107: 2001. 7-12.

24. LORITO M; HAYES C K; DI PIETRE A; WOO S L; HARMAN. G. F. *Purification , Characterization , and Synergeistic activity of a glucan 1,3-b-glucosidase and an N-acetyl-b-glucosamin-idase from Trichoderma harzianum* . phytopathology 84(4): 1994. 398-405.

25. LUCAS, G. B. *Disease of tobacco*, 3rd ed. Biological Consulting Associates, Box 5726, Raleigh, NC, 1975. p.407.

26. LUO, H; SONG, F; ZHENG, ZH. Over expression in Transgenic Tobacco Reveals Different Role For The Rice Homeodomain Gene O_sBIHD1 in Biotic and a biotic Stress Responses. Journal of Experimental Botany, Vol. 56,NO. 420, 2005. pp2673-2682.

27. MARIA. J; GIL AND V. MARTENIZ- MERINO. *Determination of the salicylic acid concentration in aspirin by forming Fe+3 complexes* .WWW.iupac,org/ publications/cd/medicinal- chemistry/Exercise. 1, 11, Verion 19: 2007.1-8.

28. MATERON. M.E and MIRCETICH. S. M. *Pathogenicity and relative virulence of Phytophthora* spp. *From walnut and other plants to root stocks of English walnut trees*. Phytopathology 75: 1985. 977-981.

29. MILA. A. L; RADCLIFF. J. *Managing Diseases In Flue- cured Tobacco Guide*. N. C Copp. Ext. Serv. Bull. North Carolina State University. Raleigh. 2014. Pp. 124- 156.

30. MOERSCHBACHER, B; NOLL. U. M; FLOTT. B. E; REISENER. H. J *Lignin biosynthetic enzymes in stem rust infected, resistant and susceptible near- isogenic wheat lines*. Physiol .Mol. Plant Pathol.33: 1988. 33-46.

31. MUDRI. S; SUSINJAK. I. *Prototip pripravka za stimulaciju biljnog rasta na osnovu gljive Trichoderma harzianum*. Studij Bilinogojstvo, usmjerenje zaštita bilja, agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Svetošimunska 25. 2000.

32. PRISA. D. *Trichoderma spp. In innovative substrates for ornamentals plants*. PhD. Thesis in science of crop production. University of Pisa. Italy. 2011.

33. SABA. H; VIBHASH. D; MANISHA. M, PRASHANT. K. S; FARHAN. H. T. A; USEEF .A– *Trichoderma – a promising plant growth stimulator and biocontrol agent*. Mycosphere 3 (4), 2012. 524–531, Doi 10.5943 /mycosphere/3/4/14

34. SADASIVAM. S; AND A. MANICKAM.. *"Peroxidase. Biochemical Method "*.New Age international (p) limited publisher, 1988. 108p.

35. SCHNEIDER. M; SCHWEIZER. P, MEUWLY. P, METRAUX. J. P. *Systemic acquired resistance in plants.* Intern Rev Cytology. 168: 1996. 303-340.

36. SHEW. H. D; LUCAS, G. B. *Compendium of Tobacco Disease* . APS Press , St. Paul, M.N. 1991

37. SINGH. A; ISLAM .M .N. *In Vitro Evaluation of Trichoderma Spp against Phytophthora nicotianae*. Int.J.Expt.Agric.1(1) . 2010. 20-25.

38. SIVAN, A; CHET, I. *Degradation of Fungal Cell Walls By Lytic Enzymes of Trichoderma harzianum. Journal of General Microbiology* (1989), 135, 675-682.

39. TASHKOSKI. P: *Antagonism of Trichoderma Asperellum to Phytophthora parasitica var nicotianae* . TYTYH/Tobacco, Vol.63,N 7-12. 2013, 45-53.

40. THRANE. C; TRONSMA. A; JENSEN D. F. *Endo-1,3-ß-glucanase and cellulose from Trichoderma harzianum :Purification and Partial Characterization , induction of and Biological Pythium* Spp. Europ J. Plant. Pathol. 103(4) 1997:331-344.

41. WASTERNACK. C; STENZEL. I; HAUSE. B; HAUSE. G; KUTTER. C; FEUSSNER. I; AND MIERSCH. O. *The Wound Response in Tomato Role of Jasmonic Acid*. J. Pl. Physial Vol, 163, 2006. PP. 297-306.

42. WATANABE. T. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*. Book . Second Edition. 2002. PP.486