مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (35) العدد (7) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (35) No. (7) 2013

دراسة القدرة التضادية للرشاحة السائلة لعزلة من الفطر *Trichodermaharzianum* تجاه بعض الفطريات الممرضة للنبات والإنسان

الدكتورة ميساء يازجي*

(تاريخ الإيداع 18 / 8 / 2013. قبل للنشر في 17 / 11 / 2013)

□ ملخّص □

اختبرت القدرة التضادية للرشاحة السائلة للفطر *Trichodermaharzianum* بتراكيز مختلفة (5، 10، 20 و30%) تجاه الفطريات الممرضة للنبات والإنسان التالية: *Aspergillusniger*، *Rhizopusstolonifer*، *Fusariumoxysporum*، *F.moniliforme*، *Alternariaalternata* و*Candida albicans* ضمن الشروط المخبرية بالدرجة 25 مْ. بيّنت النتائج فعاليّة عالية للرشاحة في تثبيط نمو الفطريات المدروسة.

اختلفت هذه الفعاليّة باختلاف الأنواع الفطريّة واختلاف التراكيز المستخدمة من الرشاحة، وكانت الفعالية الأكبر تجاه الفطر *A. niger* الذي أظهر نسبة تثبيط وصلت إلى 96.3% بالتركيز 30%، في حين سجلت النسبة الأدنى للتثبيط والتي وصلت إلى 77.6% مع الفطر *A. Alternate* مقارنة بالفطريات الأخرى.

لم تؤثّر الرشاحة في قطر مستعمرات الفطر *R. stolonifer* بالتركيزين 5 و10% لكنها كانت مستعمرات هشّة وضعيفة وثبّطت التبوغ بشكل واضح.

بيّنت الرشاحة قدرة تضاديّة جيّدة تجاه الفطر الممرض للإنسان *C. Albicans* وقد وصل قطر تثبيط النمو إلى 1.38 سم بالتركيز 30%.

الكلمات المفتاحيّة: الرشاحات السائلة، *Trichodermaharzianum*، فعاليّة تثبيطيّة، فطريات ممرضة.

***أستاذ مساعد – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.**

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (35) العدد (7) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (35) No. (7) 2013

Study of antagonistic capability of liquid culture filtrate of isolate of *Trichoderma harzianum* against some plant and human pathogenic fungi

Dr. Maysa Yaziji*

(Received 18 / 8 / 2013. Accepted 17 / 11 /2013)

□ ABSTRACT □

The antagonistic activity of liquid culture filtrate of *Trichodermaharzianum* at different concentrations (5, 10, 20 and 30%) was evaluated "in vitro" at 25 C° against following plant and human pathogenic fungi: *Aspergillusniger, Rhizopusstolonifer, Fusariumoxysporum, F.moniliforme, Alternariaalternata and Candida albicans.*

The results showed high level activity of culture filtrate inhibiting the growth of tested fungi.

The activity was varied with the different species of fungi and the different concentrations of culture filtrate. The highest activity was against fungus *A.niger* which showed precent inhibition equal 96.3% at 30% concentration. Whereas the lowest inhibition percentage to 77.6% was recorded for fungus *A.alternata* in comparison with other fungi.

The culture filterate was not affected the radial colonies growth of *R.stolonifer* at 5% and 10% concentrations, however the colonies was fragile and weak, and clearly inhibited the spores formation.

The culture filtrate was showed high antagonistic capability against the human pathogenic fungus *C.albicans*, and the radial inhibition growth was 1.38 cm at 30% concentration.

Key words: Liquid culture filtrate, *Trichoderma harzianum*, inhibiting activity, Pathogenic fungi.

***Associate professor, Department of plant biololgy , Faculty of sciences, Tishreen university, Lattakia , Syria.**

مقدمة:

تعدّ أنواع جنس *Trichoderma* من الفطريات الخيطيّة الرميّة واسعة الانتشار في بيئات متنوّعة، ومن السهل عزلها من أنماط مختلفة من الترب، ومن البقايا النباتية، والمجال الجذري للنباتات، حيث تنمو بسرعة وتغزو معظم سطح الوسط المغذّي خلال 5 أيام (Harment*et al.*,2004).

تبيّن هذه الفطريات مدىً واسعاً من أشكال الحياة والفعالية والتضاد مع حيوانات ونباتات وفطريات أخرى كما أنها تثبط نمو بعض الجراثيم مثل *Staphylococus* و coli *Escherchia*، وتثبط أو تقتل بعض أطوار نيماتودا تعقد جذور البندورة (كوريني والعلي، 1999 ;يازجي وآخرون، 2013)، ونظراً لقدرتها على مقاومة الفطريات الممرضة للنباتات، وزيادة مقاومة النباتات تجاه الممرضات أو تنشيط نمو النباتات واستجاباتها الدفاعيّة المختلفة (Harman,2012; Druzhinina*et al.*,2011)، فقد استخدمت عزلات عديدة منها كعوامل مكافحة حيويّة فعّالة ضد العديد من ممرضات النباتات الهامّة اقتصادياً، وذلك عن طريق تطبيق الـ*Trichoderma* على النباتات أو على بذورها أو جعلها تنمو على جذور هذه النباتات (Ayoubi*et al.*,2012; Abiala*et al.*,2010; Rahman *et al.*,2012).

أجريت دراسات عديدة لتحديد قدرة كل من أبواغ ورشاحة ومستخلصات أنواع الـ*Trichoderma* في تثبيط نمو فطريات ممرضة ومخرّبة للنباتات، وإمكانيّة التحكّم بالقدرة الإمراضيّة لهذه الأخيرة، وذلك بهدف إدخال طرائق المكافحة غير الكيميائيّة للحدّ من تلف وتخرّب المحاصيل بعد الحصاد والتي أصبحت هامّة بشكل متزايد (Senthil*et al.*,2011; Adebesin*et al.*,2009; Murtaza*et al.*,2012).

بيّنت إحدى الدراسات أن كلّاً من أبواغ ورشاحة الفطر *T.viride* تثبّط وبشكل جيّد نمو وتبوغ الفطرين *Drechslerabiseptata* و*Fursariummoniliforme* المسببين لتعفن جذور القمح، وتخفّض من ظاهرة تعفّن الجذور في الحقل (Abu-Taleb and Al-Mousa, 2008)، كما أن المركبات المنتشرة في الوسط والمركبات الطيّارة والرشاحة السائلة لـ*T.viride, T.harzianum*] تثبّط نمو الفطر *Fusariumsolani* المسبّب لعفن جذور البندورة وذلك في التجارب المخبرية والحقليّة، وتخفّض نسب الإصابة بالمرض بشكل واضح، وكان الفطر *T.harzianum* ذا فعاليّة أقوى من *T.viride* في تثبيط النمو والتقليل من الإصابة (Bokhari and Perveen, 2012).

تختلف الفعاليّة باختلاف نوع الـ*Trichoderma* والعزلة ونوع الفطر الممرض المُختبر وطريقة الاختبار (Diaz *et al.*,2013)، وقد بيّن (2011)Sreedevi*et al.*أن عزلتين من بين خمس عزلات تابعتين للنوعين *T.viride* و*T.harzianum* تثبطان وبشكل جيد النمو الإعاشي للفطر *Macrophominaphaseolina* المسبّب لعفن جذور الفول السوداني مقارنة بالعزلات الأخرى التي كانت أقل تأثيراً.

كما أجريت دراسة على ثلاث عشرة عزلة للفطر *T.harzianum* وتبيّن أن هذه العزلات تثبط نمو بعض الفطريات الممرضة القاطنة للتربة وهي: *Sclerotiumrolfsii*، *Rhizoctoniasolani* و*Fusariumoxysporum* بنسب مختلفة تبعاً للعزلة والفطر الممرض، في حين أن المواد الاستقلابية الخام لهذه العزلات تثبط بشكل كامل نمو جميع الفطريات المختبرة والذي يعود إلى عوامل وراثيّة (Choudary*et al.*, 2007).

كما لاحظ (Zafari*et al.*2008) أن أربع عزلات من النوع *T.virens* وعزلة من *T.koningii* تستطيع أن تغزو وتغطّي مستعمرة الفطر *Gaeumannomycesgraminis* الممرض للقمح، وذلك بطريقة الزراعات الثنائية

المتقابلة، لكن المركبات الطيارة ورشاحة هذه العزلات تثبّط النمو الإعاشي لهذا الفطر بنسب عالية.إضافة إلى ذلك فإن لرشاحة الفطر *T.harzianum* تأثير قاتل لبعض فطريات العفن أو مثبط لإنتاش أبواغ فطريات مسبّبة لعفن ثمار البندورة خاصة *Alternariaalternata*، كما يسبب تشوّهاً للأبواغ وللخيوط الفطرية (El-Katatny and Emam,2012; Tarus*et al.*,2004).

تعدّ أنواع ال*Trichoderma* مصدراً للعديد من المركبات الناتجة عن الاستقلاب الثانوي والتي عزل بعضاً منها من *T.virens* وتبيّن أنها تملك فعالية جيدة تجاه ممرضات تابعة لـ*Rhizoctonia*، *Macrophomina*، *Pythium*، *Sclerotium*(Singh *et al.*,2005)، ومصدراً للعديد من الأنزيمات الهامّة بيئياً وصناعيّاً، وغيرها من المركبات، وقد تمّ عزل وتنقية بعضهامن *T.harzianum* و*T.atroviroide* وتبيّن أن لها علاقة وثيقة بالفعالية المضادة للممرضات النباتيّة *Botrytis fabae* و*Phomopsistheae*، حيث ثبّطت نمو هذه الأخيرة بالكامل (Anita *et al.*.2012; Haggag*et al.*,2006).

أهمية البحث وأهدافه:

تعدّ الفطريات الممرضة والأعفان مشكلة كبيرة بالنسبة للحياة البشرية، بسبب انتشارها الواسع في معظم الأوساط وقدرتها على البقاء لمدة طويلة في الشروط غير المناسبة.وهذه الأنواع، إضافة إلى كونها، مصدراً كبيراً للتلوث البيئي والغذائي، فإن العديد منها يسبب أمراضاً خطيرة تصيب النبات والإنسان والحيوان، وقد تؤدي إلى الموت وانخفاض في نوعية المنتجات الزراعية.

إن استخدام وسائل المكافحة الكيميائية للقضاء على هذه الفطريات، قد تكون غير مجدية أحياناً، إضافة إلى آثارها السلبية على البيئة والإنسان بسبب تراكم المواد السامة بشكل كبير، لهذا كان لا بد من إيجاد طرائق بديلة سليمة وآمنة بيئياً وصحيّاً لمكافحة هذه الفطريات، لذلك أتى هذا البحث الذي يهدف إلى:

1- عزل وتحديد بعض الفطريات الممرضة من عينات ترب زراعية، وتنقية الأنواع المدروسة.

2- تحضير رشاحة الزراعات السائلة لعزلة من الفطر *T.harzianum*.

3- دراسة مخبرية للقدرة التضادية للرشاحة بتراكيز مختلفة، تجاه بعض الفطريات الممرضة.

4- تحديد الأنواع الأكثر حساسيّة والتراكيز الأكثر فعالية للرشاحة.

طرائق البحث و مواده:

1-العزلات الفطريّة: استخدم في هذا البحث عزلة من النوع *T.harzianum* وذلك لتجريب فعاليتها تجاه عدد من الأنواع الفطرية الخيطية الناقصة وهي:

Aspergillusniger، *Rhizopusstolonifer*، *Fusariumoxysporum*، *Fusariummoniliforme*، *Alternariaalternata*.

تم الحصول على جميع العزلات اعتباراً من عينات ترب مختلفة، بطريقة محاليل التربة، حيث استنبتت التراكيز المختلفة للتربة على وسط خلاصة البطاطا-ديكستروز- آغار(PDA)، وحُضنت بالدرجة 25 مْ لمدة 5-7 أيام، ومن ثم تم تنقية وتحديد الأنواع المدروسة وفقاً للمعايير التصنيفيّة المتبعة في المراجع، والتي تعتمد على العديد من الصفات المورفولوجية والمجهرية للمستعمرات (Botton*et al.*,1990).

كما تم تجريب فعالية الفطر *T.harzianum* تجاه عزلة من الفطر *Candida albicans* التي تم الحصول عليها من عيّنة مرضية من مشفى الأسد الجامعي، استنبتت على وسط PDA وحُضنت بالدرجة 28 مْ لمدة 48 ساعة.

حُفظت جميع هذه العزلات على وسط PDA في الثلاجة لحين الاستخدام.

2- تحضير الرشاحة الفطرية:

حضرت رشاحة الفطر *T.harzianum* بزراعته ضمن حوجلات زجاجية(سعة 250 مل) حاوية على 200 مل من وسط خلاصة البطاطا–ديكستروز–السائلة (PDB), حيث لقّح الوسط بثلاثة أقراص بقطر 5 مم أخذت من محيط مزرعة فتية لهذا الفطر بعمر 7 أيام، والمستنبتة بشكل مسبق في طبق بتري على وسط PDA (Odebode, 2006).

حضنت الحوجلات بالدرجة 25 مْ، في حمام مائي هزاز بمعدّل 100 هزة/دقيقة لمدة 15 يوماً (Abiala *et al.*,2010).

بعد ذلك فصلت الكتلة المشيجية للفطر بترشيح الزراعات ضمن شروط معقّمة بوساطة أوراق ترشيح Whatman No.1، ثم مررت في مرشحة جرثومية للتعقيم وللتخلص من جميع الأجزاء الفطرية المتبقّية (Zafari *et al.*,2008). حفظت الرشاحة السائلة النقية في حوجلات معقمة ضمن الثلاجة لحين الاستخدام.

3-تحديد الفعالية التثبيطية لرشاحة الفطر *T.harzianum*:

تم تحديد الفعالية ضد الفطريات المدروسة باستخدام طريقة الأطباق الآغارية كما يلي:

أ.فعالية الرشاحة تجاه الفطريات المشيجية:

استخدمت عدة تراكيز من الرشاحة وذلك بإضافة كميات مناسبة منها إلى عدة حوجلات يحوي كل منها 200 مل من وسط PDA المُدعّم بالآغار (يحوي 30% آغار) والمثبت بالدرجة 45 مْ، للحصول على التراكيز النهائية 5، 10، 20 و30% (Kucuk and Kivanc, 2003)، بعد المزج وزع الوسط في أطباق بتري 9 سم وتركت لتبرد. لقحت هذه الأطباق بأقراص قطر كل منها 5 مم، أخذت من أطراف مستعمرات فتية للفطريات المختبرة حيث وضع قرص واحد في مركز كل طبق. أما أطباق الشاهد فقد تم تلقيحها بالفطريات المختبرة ضمن أطباق تحوي وسط PDA الخالي من الرشاحة.

تم إجراء 3 مكررات لكل تركيز وكل فطر من الفطريات المختبرة.

حضنت الأطباق بالدرجة 25 مْ، وقرئت النتائج يومياً لمدة 7 أيام.

تم تقدير الفعالية التثبيطية بحساب متوسط قطر المستعمرات النامية في المكررات بعد 7 أيام من الحضن، وحسبت النسبة المئوية للتثبيط (Yadav *et al.*,2011) كما يلي:

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{متوسط قطر مستعمرة الشاهد} - \text{متوسط قطر مستعمرة المعامل بالرشاحة}}{\text{متوسط قطر مستعمرة الشاهد}} \times 100$$

ب. فعالية الرشاحة تجاه الفطر *C.albicans*:

تم تحديد الفعالية بطريقة الحفر، حيث صب وسط PDA في الأطباق وترك ليبرد، لقحت هذه الأطباق بفرش 0.2 مل من معلق خلوي للفطر *C.albicans* بتركيز 10^6 خلية/مل، ثم تركت لتجف، بعدها أجريت 4 حفر في كل طبق بقطر 5 مم وضع في كل منها 200 ميكرولتر من رشاحة الفطر بتراكيز مختلفة (5 ، 10 ، 20 ، و30%) التي تم تحضيرها بشكل مسبق بإضافة كميات مناسبة من الوسط PDB إلى الرشاحة للحصول على التركيز المطلوب،أما أطباق الشاهد فقد تمت بوضع 200 ميكروليتر من الوسط PDB النقي.

أجريت ثلاثة مكررات للزراعات المعاملة وللشاهد، ثم تركت لتجف، وحضنت بالدرجة 28 مْ لمدة 48 ساعة.قدرت الفعالية بقياس قطر التثبيط حول كل حفرة وحساب متوسط أقطار التثبيط.

النتائج والمناقشة:

1- الأنواع الفطرية الممرضة المدروسة :

حصلنا على عدد كبير من الفطريات الخيطية من ترب مزروعة بالبندورة والباذنجان بطريقة محاليل التربة وقد حدِّدت هذه الفطريات وفقاً لشكل المستعمرات وألوانها من الناحية العلوية والسفلية وسرعة نموها ,وأشكال الحوامل البوغية وطريقة تفرعها وشكل الأبواغ وألوانها وأحجامها (Botton*et al.*, 1990) , وقد تم اختيار خمسة أنواع منها , هامة اقتصادياً, لدراستها في هذا البحث, بعضها يسبب أمراض الذبول الوعائي وتعفن الجذور والثمار والأزهار والحبوب وتبقع الأوراق للعديد من النباتات, وبعضها يصيب الجهاز التنفسي للإنسان, وهذه الأنواع هي : *Aspergillusniger*، *Rhizopusstolonifer*، *Fusariumoxysporum*، *Fusariummoniliforme* ، *Alternariaalternata*.

كما حصلنا على الفطر*C . albicans* والذي يصيب الأغشية المخاطية والجلد والأظافر وجهاز التنفسعند الإنسان أو يسبب أمراضاً شاملة لديه , وذلك اعتباراً من عينة مرضية, وتم تحديده وفقاً للشكل الخمائري وتبرعمه وخيوطه الكاذبة الحاملة للأبواغ البرعميةوالكلاميدية وأحجامها .

2- تأثير رشاحة الفطر *T.harzianum* في نمو الفطريات الخيطية المختبرة:

تم اختبار فعالية الرشاحة السائلة للفطر *T.harzianum* بتراكيز مختلفة في تثبيط نمو بعض الفطريات الخيطية الممرضة للنبات والإنسان، وقد بيّنت النتائج قدرةهذه الرشاحة في تثبيط نمو الفطريات المدروسة بشكل متباين وذلك تبعاً للأنواع الفطرية المختلفة وللتركيز المستخدم من الرشاحة.

نلاحظ في الجدول (2)أن متوسط قطر مستعمرات الفطريات المدروسة بعد 7 أيام من الزراعة يتناقص بازدياد تركيز الرشاحة وذلك بالنسبة لكل فطر على حدة، وبشكل عام كانت الفعالية واضحة في التركيز الأعلى المستخدم (30%) بالنسبة لجميع الفطريات المختبرة، والتأثير الأكبر كان تجاه الفطر *A.niger* حيث بلغ متوسط قطر المستعمرات 0.2 سم، يليه الفطر *F.moniliforme* بقطر 0.6 سم،والتأثير الأقل كان تجاه الفطر *R.stolonifer* (1.7) سم. وقد بينت دراسة لـ Anita *et al.* (2012) على رشاحة النوع *T.atoviride* انخفاضاً سريعاً في النمو الخطي للفطر *phomopsistheae*وذلك بازدياد تركيز الرشاحة المستخدممن50ppmوحتى500 ppm. كما بيّن Gawade*et al.*(2012) ازدياد تثبيط نمو مشيجة الفطر *F.moniliforme* بازدياد تركيز الرشاحة السائلة لست عزلات من الفطر *Trichoderma* اعتباراً من التركيز 25% حتى التركيز 100%، وذلك في جميع الاختبارات التي تمت وبكلتا طريقتي الزراعات الثنائية والزراعات بوجود الرشاحة السائلة، لكن تبقى عزلة الفطر *T.harzianum* التي استخدمت في بحثنا هذا ذات فعالية أقوى تجاه الفطر *F.moniliforme* والذي أعطى مستعمرة لا يتجاوز قطرها 1.5 سم بتركيز 20% من الرشاحة، في حين كان Gawade*et al.*(2012)قد بين نموّاً لهذا الفطر الأخير يعادل 2.6 سم بوجود 25% من الرشاحة.

بينت نتائج النسب المئوية للتثبيط (جدول2) أن رشاحة الفطر *T.harzianum* تؤثّر بشكل واضح في نمو الفطريات المختبرة وذلك اعتباراً من التركيز 5% ما عدا الفطر *R.stolonifer* الذي لم يتأثر نموّه إلا اعتباراً من

التركيز 20%، حيث نلاحظ نسبة تثبيط عالية وصلت إلى 69.4% في التركيز الأخير، وهذا يعادل مستعمرات متوسط قطرها 2.6 سم ، أما في التركيز 30% فقد وصلت النسبة إلى 80% وكان متوسط قطر المستعمرات 1.7 سم مقارنة بالشاهد (الشكل1). حيث نمت المشيجة بشكل كثيف وتبوّغت بشكل كبير وعلى كامل سطحها في الأطباق الشاهدةأما في الأطباق المعاملة بالتركيزين 5% و10% فقد كانت ضعيفة، هشّة، قليلة الكثافة، تتبوّغ بشكل ضعيف، ويقتصر التبوّغ على أطراف المستعمرة فقط في التركيز 10% ،

مما يدل أن الرشاحة بهذين التركيزين لم تؤثّر في نسبة نمو الفطر *R.stolonifer* ولكنها أثّرت في إمكانية إنتاجه لأبواغه، وقد توافقت هذه النتيجة مع دراسة(El-Katatny*et al.*2011) التي بيّنت عدم تأثّر الفطر *R.stolonifer* بفطر *T.harzianum* في الزراعات المتقابلة، لكن هذا الأخير استطاع أن ينمو فوق الفطر الممرض بالتركيز 100% بعد 9 أيام من الحضن.هذا وكان Mokhtar and Dehimat (2012) قد بيّنا أن المركبات الطيارة للفطر *T.harzianum* لم تؤثر كثيراً في نمو مستعمرات الفطر .*Alternaria* sp، فقد كانت نسبة تثبيط هذا الأخير 5.76% في اليوم السابع من الحضن.

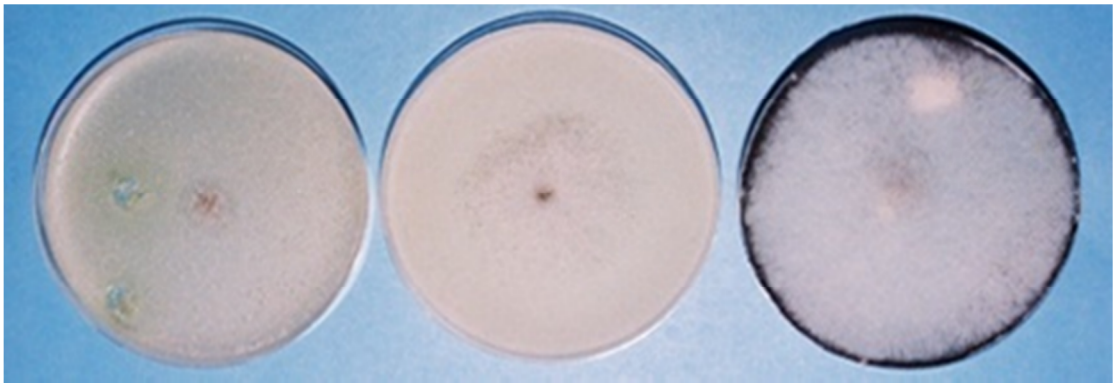
جدول2: متوسط قطر مستعمرات الفطريات المختبرة النامية بوجود تراكيز مختلفة من الرشاحة السائلة للفطر *Trichodermaharzianum* والنسب المئوية لتثبيط النمو.

الفطريات المختبرة	متوسط قطر المستعمرات بعد 7 أيام من الحضن (سم)					النسب المئوية لتثبيط النمو				
	تراكيز الرشاحة السائلة					تراكيز الرشاحة السائلة				
	%0	%5	%10	%20	%30	%0	%5	%10	%20	%30
A.niger	5.4±0.07	3.1±0.21	3±0.14	0.7±0.14	0.2±0.00	.	43.1	44.9	87.1	96.3
R.stolonifer	8.5±0.00	8.5±0.07	8.5±0.21	2.6±0.14	1.7±0.07	.	.	.	69.4	80
F.oxysporum	6.5±0.00	5±0.00	4.3±0.07	1.8±0.00	0.8±0.14	.	23.0	33.8	72.3	87.6
F.moniliforme	6.3±0.14	4.4±0.21	3.8±0.21	1.5±0.07	0.6±0.00	.	30.1	39.6	76.1	90.4
A.alternata	6.7±0.14	5.2±0.21	4.5±0.14	2.9±0.07	1.5±0.00	.	22.3	32.8	56.7	77.6

تمثل القيم المبيّنة في الجدول متوسط ثلاث مكررات

± هيالإنحراف المعياريSD (Standard diviation).

لكنها خربت وحللت خيوطه الفطرية ومنعت تشكل أبواغه، كما أن الرشاحة غير المخففة (بالتركيز 100%) قد ثبطت بالكامل إنتاش أبواغ الفطر .*Alternaria* sp، *A.niger* و*F.Solani* (Odebode,2006)، في حين غيّرت المركبات المنتشرة في الوسط أو الطيارة لهذا الفطر من شكل مستعمرة الفطر *A.alternata*، وسبّبت تشوّهاً في الخيوط الفطرية والحواجز كما ثبطت وبشكل واضح التبوغ (Gveroska and Ziberoski,2012).



C B A

الشكل 1 : فعالية رشاحة الفطر *T.harzianum* في نمو الفطر *R.stolonifer* .

A –الشاهد، يبين التبوغ الكبير للفطر .

B و C– الفطر بوجود 20% و 30% من الرشاحة على الترتيب. يلاحظ تثبيط أو منع التبوغ.

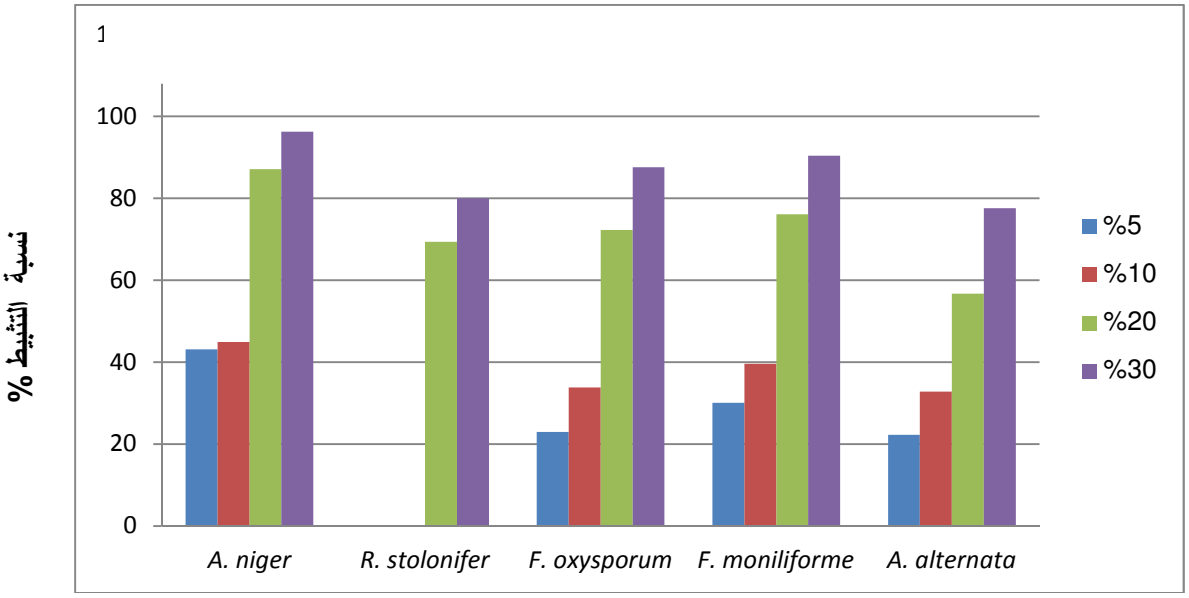
يبيّن الشكل 2 أن نسب تثبيط الفطريات المختبرة كانت عالية، خاصة في التركيز 30%، وكان التأثير الأكبر في نمو الفطر *A.niger* الذي بلغت نسبة التثبيط فيه 96.3%، يليه الفطر *F.moniliforme* (90.4%)، ثم *F.oxysporum* (87.6%) و*R.stolonifer* (80%) وأخيراً *A.alternata* (77.6%).

وقد توافقت هذه النتائج مع نتائج عدد من الدراسات السابقة التي بينت أن الفطر *T.harzianum* أو رشاحته تؤثر في نمو *A.niger* بشكل أكبر من تأثيره في فطريات أخرى مختبرة مثل*Alternaria*.sp، فقد بيّن Odebode (2006) أن نسبة تثبيط *A.niger*، المعزول من الثمار المتعفّنة طبيعياً، بوساطة رشاحة *T.harzianum* كانت 24.4% في حين كانت نسبة تثبيط الـ .*Alternaria* sp المعزولة من الثمار ذاتها تعادل 16.7%، و*F.solani* 15.0% وذلك عند استخدامه نسبة رشاحة 1:3 في الوسط المغذي.

كذلك بيّن Mumtaz*et al.* (2012) أن الفطر *T.harzianum* يؤثر في نمو *A.niger* بنسبة 65.1% يليه *F.oxysporum* بنسبة 61.5% ثم *A.alternata* 57.3%.

أما Bhale*et al.* (2013) وعند دراستهم فعالية عدة أنواع من الـ*Trichoderma* تجاه عدة أنواع من الفطريات المسبّبة لعفن ثمار الزعرور ذاتها، فقد وجدوا أن *T.harzianum* كان النوع الأكثر فعالية، وقد أثر في نمو *A.niger*بنسبة تثبيط 54.4% أعلى من تأثيره في *Rhizoctoniasolani* والتي كانت نسبة تثبيطه 38.80% وذلك في الزراعات الثنائية.

لكن بالمقابل بيّن Al-obaidy and Al-rijabo (2010) أن الرشاحة غير المخففة لعزلة الفطر *T.harzianum* التي استخدمت في دراستهما أثرت في نمو الفطر *A.alternata* بقطر تثبيط للمستعمرة بلغ 1.5 سم، لكنها لم تؤثّر إطلاقاً في نمو الفطر *A.niger*. وهناك دراسة أخرى بينت أن عزلة *T.harzianum* تؤثر في *A.alternata* بشكل أكبر بنسبة بلغت 77.7% مقارنة بـ*F.oxysporum* (66.6%) و*A.niger* (54.4%) وذلك في الزراعات الثنائية (Rajkonda*et al.*,2011)، مما يدل على اختلاف قدرة العزلات المختلفة لـ*T.harzianum* في فعاليتها تجاه النوع ذاته من الفطر الممرض والذي يعود إلى اختلاف في المركبات الاستقلابية وتنوّع الأنزيمات خارج الخلوية التي تنتجها هذه العزلات المختلفة (Gachomo and Kotchoni,2008Thanaboripat et al.,2009,).



شكل 2: النسب المئوية لتثبيط نمو الفطريات المختبرة بتراكيز مختلفة من الرشاحة السائلة لـ *T.harzianum*.

من الجدير بالذكر أن التزايد التدريجي بتأثير الرشاحة اختلف أيضاً باختلاف الفطريات المختبرة، حيث لاحظنا أن الفروقات بنسب التثبيط لم تكن واضحة إطلاقاً في التراكيز المنخفضة بين الفطرين *F.oxysporum* و*A.alternata* والتي بلغت 23.0% و22.3% في التركيز 5%، و33.8% و32.8% في التركيز 10% وذلك بالنسبة للفطرين المذكورين على الترتيب، لكن هذا التأثير اختلف بشكل ملحوظ سواءً بين الفطرين المذكورين أو بالنسبة للفطر ذاته اعتباراً من التركيز 20% حيث بلغت نسبة التثبيط 72.3% للأول و56.7% للثاني في هذا التركيز الأخير.

أما في التركيز 30% فقد ازداد التأثير في نمو *A.alternata* بشكل كبير مقارنة بالتركيز الأدنى (20%) حيث بلغت نسبة التثبيط 77.6% وهي نسبة عالية جداً إذا ما قورنت بنسبة تثبيط الفطر *T.harzianum* لإحدى سلالات النوع *A.alternata* التي درسها Mokhtar and dehimat (2013) والتي بلغت 26.66% في الزراعات المتقابلة و28% بالنسبة للمركبات الطيّارة، ويمكن تفسير ذلك بإمكانية تأثير المركبات الاستقلابية التي ينتجها فطر الـ*Trichoderma* في الوسط السائل بشكل أكبر من تأثير المركبات الطيارة أو تلك المنتشرة في الوسط الصلب، فقد وجد Sreedevi *et al.*, (2011) أن نسبة تثبيط المركبات الاستقلابية (الرشاحة السائلة) لنمو الفطر *Macrophominaphaseolina* بلغت 72.7% بالتركيز 40%، في حين بلغت النسبة 64.4% في الزراعات الثنائية المتقابلة و39.5% بالنسبة للمركبات الطيارة بعد 72 ساعة من الحضن.

كما أكّدت عدّة دراسات أن الأثر التثبيطي للمركبات غير الطيارة الموجودة في الرشاحة السائلة لزراعات أنواع عدّة من الـ*Trichoderma* تجاه عدد من الفطريات الممرضة أكبر وبشكل واضح من تأثير المركبات الطيارة التي تتشكل في بداية مرحلة الزراعات، والذي يعود إلى وجود المركباتالإستقلابية المضادة في الرشاحة بكمية ونوعية أعلى من تلك للمركبات الطيارة أو المنتشرة في الوسط (Harman and Kubicek,1998; Zafari *etal.*,2008; Singh *etal.*,2005; El-Katatny *etal.*.2011; Ajith and Lakshmidevi.,2010).

تشير نتائج هذا البحث المتعلقة بتأثير رشاحة الفطر *T.harzianum* في نمو عدد من الفطريات الخيطية الممرضة وبنسب مختلفة إلى إنتاج مركبات استقلابية عديدة مختلفة في الزراعات السائلة لهذا الفطر، تملك قدرة تضادية تجاه الفطريات المدروسة، وقد أكّدت دراسات عديدة سابقة أن أغلب أنواع هذا الفطر تنتج مركبات استقلاب ثانوي طيّارة وغير طيّارة فيوسط النمو، تثبط نمو طيف واسع من الفطريات الممرضة أو المسببة للأعفان أو غيرها من الكائنات، تضم هذه المركبات بعضاًمن المضادات الحيوية مثل Trichodermin، Trichodermol، Harzianum A، Harzianolide (Kucuk and Kivanc,2004)، كذلك العديد من السموم الفطرية والأنزيمات المحللة للجدر الخلوية والمفكّكة للسكريات مثل Chitinases، B-glucanase، Amylase، Cellulase، Protease (Woo *et al.*,2006; Kubicek*et al.*,2001).

تمت زراعة الفطر *T.harzianum* في هذا البحث بالدرجة 25 مْ وقد كانت الفعالية التثبيطية لرشاحته عالية تجاه الفطريات المختبرة ووصلت إلى نسب تثبيط مرتفعة خاصة في التركيز الأعلى المستخدم (30%)، تجعله قادراً على ضبط نمو هذه الفطريات، وقد تمّ اختيار هذه الدرجة بناءً على دراسات سابقة جرت لاختبار وتحديد الدرجة الفضلى اللازمة لنمو هذا الفطر، حيث تعدّ الحرارة عاملاً هامّاً يؤثر في نمو الفطريات وتبوغها وفي قدرتها على الترمم وإنتاج مواد استقلابية غير طيّارة وأنزيمات خارج خلوية تستخدمها في التغذية والمنافسة وتحليل الجدر الخلوية للفطريات الممرضة، وقد أكّدت بعض هذه الدراسات أن الدرجة 25 مْ هي الأمثل، من بين الدرجات الأخرى المختبرة، لنمو الفطر *T.harzianum* وإنتاجه المواد الاستقلابية غير الطيارة حيث كانت فعالية رشاحته السائلة الأعلى ضمن هذه الشروط وأعطت نسب تثبيط مرتفعة تجاه الفطر *F.oxysporum* والفطر *R.stolonifer* (Bomfim*etal*,2010; Perveen and Bokhari,2012).

3- تأثير رشاحة الفطر *T.harzianum* في نمو الفطر *C.albicans*:

أظهرت نتائج اختبار فعالية الرشاحة تجاه الفطر الممرض للإنسان *C.albicans*، أن هذه الرشاحة تؤثر وبشكل متدرّج في نموهذا الفطر الممرض وذلك في التراكيز المستخدمة.

يبين الجدول 3 متوسط أقطار التثبيط لزراعات الفطر *C.albicans*والتي بلغت 0.55، 1.08، 1.21 و1.38 سم بالتراكيز 5، 10، 20 و30% من الرشاحة على الترتيب.

جدول3:متوسط أقطار تثبيط نمو الفطر *C.albicans* بوجود تراكيز مختلفة من الرشاحة السائلة للفطر *T.harzianum*.

الفطر	أقطار التثبيط بـ سم				
	تراكيز الرشاحة السائلة				
	%0	%5	%10	%20	%30
C.albicans	0	0.55	1.08	1.21	1.38

يدل هذا التأثير على أن الرشاحة السائلة للفطر *T.harzianum* تحوي مركبات استقلابية وأنزيمات قادرة على تثبيط نمو الفطر *C.albicans*، وقد بيّنت دراسات سابقة على نباتات طبية مختلفة أن خلاصات بِمُحِلات مختلفة لنباتات مثل الإيفوربيا وإكليل الجبل والمردقوش والحلبة والنعنع والجرجير واليانسون والزنجبيل والأكاسيا وغيرها، تملك تأثيراً واضحاً وتثبّط نمو عدد كبير من عزلات *C.albicans* أغلبها عزلت من عينات مرضية فموية

(Darwish and Aburjai.,2011; Hofling*et al.*,2011)، لكن التجربة التي تمّت في هذا البحث تبيّن أهمية المركبات الناتجة في رشاحة الفطر *T.harzianum* في تثبيط نمو أحد الفطريات الممرضة للإنسان.

الاستنتاجات والتوصيات:

- الاستنتاجات :

1-امتلاك الرشاحة السائلة لعزلة الفطر *T.harzianum* المدروس قدرة تضادية عالية تجاه الفطريات الممرضة المختبرة في الشروط المخبرية المدروسة.

2-اختلفت الفعالية التثبيطية للرشاحة باختلاف الفطريات وكانت الأعلى تجاه الفطر *A.niger* بالتركيز 30% والأدنى تجاه *A.alternata*.

3-استطاعت الرشاحة السائلة تثبيط تبوغ الفطر *R.stolonifer* بشكل واضح.

4-إمكانية تطبيق العزلة *T.harzianum* المدروسة في المكافحة الحيوية لبعض الفطريات الممرضة.

التوصيات :

1- دراسة آليات تضاد عزلة الفطر *T.harzianum* المدروس تجاه الفطريات المختبرة وتأثير المركبات الطيّارة فيها.

2-تحديد الأوساط الزرعية والشروط الأمثل لإنتاج المركبات الاستقلابية في الرشاحة.

3-استخلاص المواد الفعالة للرشاحة بمحلات مختلفة وتحديد هذه المواد ودراسة فعاليتها المضادة للفطريات .

4- اختبار تأثير القدرة التضادية للرشاحة في شروط الحقل وإمكانية تطبيقها في مكافحة أمراض النبات.

المراجـع:

1. كوريني، صلاح؛ العلي، خليل، دراسة القدرة التضادية لثلاثة أنواع من الفطر *Trichodermapers*. معزولة من بعض الترب السورية، مجلة بحوث جامعة حلب، سلسلة العلوم الأساسية، العدد 30، 1999.

2. يازجي، ميساء؛ ألوف، ندى؛ قسام، رامي، تقييم فاعلية رشاحاتعزلات محلية من فطريات *Trichoderma* في مكافحة بعض أطوار نيماتودا تعقد الجذور (*Meloidogyneincognita*) تحت الظروف المخبرية. مجلة وقاية النبات العربية، مجلد 31، عدد 2، 2013.

3- ABIALA,M.A.;OGUNJOBI,A.A.; ODEBODE, A.c. and AYODELE,A.C. and AYODELE, M.A. Microbial control of *Mycosphaerellafijiensis*Morelet a notable pathogen of Bananas and plantains. Nature and science, Vol.8, No.10, 2010, 299-305.

4- ABU-TALEB,A.M. and AL-MOUSA,A.A. Evaluation of antifungual activity of vitavax and *Trichodermaviride* against two wheat root rot pathogens. Journal of Applied Bioscences, Vol.6, 2008, 140-149.

5- ADEBESIN,A.A.; ODEBODE,C.A. and AYODELE,A.M. Control of postharvest rots of Banana fruits by conidia and culture filtrates of *Trichodermaasperellum*. Journal of plant protection research, Vol.49, No.3, 2009, 302-308.

6- -AJITH,P.S. and LAKSHMIDEVI, N. Effect of volatile and non-voltile compounds from *Trichodermaspp*. Against *Colletriechumcapsici*incitant of Anthracnose on Bell peppers. Nature and Science, Vol.8, No.9, 2010, 265-269.

7- -AL-OBAIDY,O.M. and AL-RIJABO,M.A. Antagonistic activity and production of antifungal compound (s) from selected *Trichodermaspp*. J.Edu.&Sci., Vol.23, No.3, 2010, 18-27.
8- ANITA,S.; PONMURUGAN,P. And GANESH BABU,R. Significance of secondary metabolites and enzymes secreted by *Trichodermaatroviride* isolates for the biological control of *pjomopsis* canker disease. Afr.J. Biotechnol. Vol.11, No.45, 2012, 10350-10357.
9- AYOUBI,N.; ZAFAI,D. And MIRABOLFATHY,M. Combination of *Trichoderma* species and *Bradyrhizobiumjaponicum* in control of phytophthora sojae and soybean growth. Journal of crop protection, Vol.1, No.1, 2012, 35-43.
10- BHALE,UN.; WAGH,P.M. and RAJKONDA,J.N. Antagonistic confrontation of *Trichoderma spp*. Against fruit rot pathogens. On sapodilla (*Manilkarazapota L.*). Journal of yeast and fungal research, Vol.4, No.1, 2013, 5-11.
11- BOKHARI,N.A. and PERVEEN.K. Antagonistic action of *Trichodermaharzianum* and *Trichodermaviride* against *fusariumsolani* causing root rot of Tomato. Afr.J.Microbiol. Res., Vol.6, No.44, 2012, 7193-7197.
12- BOMFIM,M.P.; SAOJOSE,A..; REBOUCAS,T.N.H.; ALMEIDA,S.S.; SOUZA,IVB. And DIAS,N.O. Antagonic effect in vitro and in vivo of *Trichodermaspp.* To *Rhizopusstolonifer* in yellow passion fruit. Summa phytopathol. Vol.36, No.1, 2010, 61-67.
13- BOTTON,B.; BRETON,A.; FEVRE,M.; GAUTHIER,S.; GUY,PH.; LARPENT.J.P.; REYMOND,P.; SAGLIER,J.J. and VAYSSIER,y. Moisissuresutiles et nuisibles, importance industrielle. Second ed., Masson, Paris, 1990.
14- CHOUDARY,A.K; REDDY,KRN. And REDDY,MS. Antifungal activity and genetic variability of *Trichodermaharzianum* isolates. J. Mycol. Pl. Pathol., Vol.37, No.2, 2007, 1-6.
15- DAWISH,RM. And ABUJAI,TA. Antimicrobial activity of some medicinal plants against different *Candida* species. Jordan Journal of pharmaceutical sciences, Vol.4, No.1, 2011.
16- DIAZ, G.; COCOLES,AI.; ASENCIO,A.D. and TORES,M.P. In vitro antagonism of *Trichoderma* and naturally occurring fungi from elms against *Ophiostoma novo-ulmi*. Forest pathology, Vol.43, No.1, 2013, 51-58.
17- DRUZHININA,I.S.; SEIBOTH,V.; HERRERA-ESTRELLA,A.; HORWITZ,B.A.; KENERLEY,C.M.; MONTE,E.; MUKHERJEE,P.K.; ZEILINGER,S.; GRIGORIEV,I.V. and KUBIEK,C.P. *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. Natue Reviews Microbiology, Vol.9, 2011, 749-759.
18- EL-KATATNY,M.H. and EMAM,A.S. Control of postharvest Tomato rot by spore suspension and antifungal metabolites of *Trichodermaharzianum*. J.Microb.Biotech. and food scie, Vol.1, No.6, 2012, 1505-1528.
19- EL-KATATNY,M.H.; EL- KATATNY,M.S.; FADL-ALLAH,E.M. and EMAM,A.S. Antagonistic effect of two isolates of *Trichodermaharzianum* against postharvest pathogens of Tomato (*Lycopersicomesculentum*). Archives of phytopathology and plant protection, Vol.44, No.7, 2011, 637-654.
20- GACHOMO,E.W. and KOTCHONI,S.O. The use of *Trichodermaharzianum* and *T.viride* as potential biocontrolagenst against peanut microflora and their effectiveness in reducing aflatoxin contamination of infected kernels. Biotechnonlogy, Vol.7, No.3, 2008, 439-447.

21- GAWADE,D.B.; PAWA,B.H.; GAWANDE,S.J. and VASEKA,V.C. Antagonistic effect of *Trichoderma* against *Fusariummoniliformae* the causal of sugarcane wilt. American-Eurasian J.Agrie. & Environ. Sci., Vol.12, No.9, 2012, 1236-1241.
22- GVEROSKA,B. And ZIBEROSKI,J. *Trichodermaharzianum* on Tobacco. Applied technologies & innovations, Vol.7, No.2, 2012, 67-76.
23- HAGGAG,W.M.; KANSOH,A.L. and ALY.A.M. Proteases from *TalaromycesFlavus* and *Trichodermaharzianum* activity against Brown Spot disease on faba bean. Plant Pathology Bulletin, Vol.15, No.4, 2006, 231-239.
24- HARMAN,G.E. and KUBICEK,C.P. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol.2, Enzymes, Biological control and commercial applications. Taylor and Francis, London. 1998, P.393.
25- HARMAN,G.E. *Trichoderma* Strains that induce resistance to plant disease and/or increase plant growth. Patent application, Vol.12, 2012.
26- HARMENT,G.; LYNCH,J. And LORITO,M. Use of *Trichoderma spp*. In remediation of polluted soils and waters. Journal of Zhejiang university, No.4, 2004.
27- HOFLING,J.F.; MARDEGAN,R.C.; ANIBAL,P.C.; FURLETTI,V.F. and FOGLIO,M.A. Evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts against oral *Candida albicans* and proteinases. Mycopathologia, Vol.172, No.2, 2011, 117-124.
28- KUBICEK,C.P.; MACH,R.L.; PETERBAUER,C.K. and LORITO,M. *Trichoderma*: From genes to biocontrol.J. Plantpathol., Vol.83, 2001, 11-23.
29- KUCUK,C. And KIVANC,M. *Invitro* antifungal activity of strains of *Trichodermaharzianum*. Turk.J. Biol. Vol.28, 2004, 111-115.
30- KUCUK,C. And KIVANC,M. Isolation of *Trichodermaspp*. And determination of their antifungal, biochemical and physiological features. Turk.J.Biol., Vol.27, 2003, 247-253.
31- MOKHTAR,H. And DEHIMAT,A. Contribution in isolation and identification of some pathogenic fungi from wheat seeds, and evaluation of antagonistic capability of *Trichodermaharzianum* against those isolated fungi *in vitro*. Agric. Biol.J.N. Am., Vol.4, No.2, 2013, 145-154.
32- MOKHTAR,H. And DEHIMATA,A. Antagonism capability *in vitro* of *Trichodermahazianum* against some pathogenic fungi. Agric. Biol.J.N.Am., Vol.3, No.11, 2012, 452-460.
33- MUMTAZ,B.; SUMIA,F.; KADAM,V.B. and YASMEEN,S. Utilization of antagonist against seed borne fungi. Trends in life sciences, Vol.1, No.1, 2012, 42-46.
34- MURTAZA,A.; SHAFIQUE,S.; ANJUM,T. And SHAFIQUE,S. *In vitro* control of *AlternariaCitri* using antifungal potentials of *Trichoderma* species. African Journal of Biotechnology, Vol.11, No.42, 2012, 9985-9992.
35- ODEBODE,A.C. Control of postharvest pathogeng of fruits by culture filtrate from antagonistic fungi. Journal of Plant Protection Research, Vol.46, No.1, 2006, 1-5.
36- PERVEEN,K. And BOKHARI,N.A. Antagonistic activity of *Trichodermahazianum* and *Trichodermaviride* isolated from soil of date plame field against *Fusariumoxysporum*. Afr.J.Microbiol. Res., Vol.6, No.13, 2012, 3348-3353.
37- RAHMAN,M.A.; SULTANA,R.; BEGUM,M.F. and ALAM,M.F. Effect of culture filtrates of *Trichoderma* on seed germination and seedling growth in CHili. International Journal of Biosciences. Vol.2, No.4, 2012, 46-55.

38- RAJKONDA,J.N.; SAWANT,V.S.; AMBUSE,M.G. and BHALE,U.N. Inimical potential of *Trichoderma* species against pathogenic fungi. Plant Sciences Feed, Vol.1, No.1, 2011, 10-13.

39- SENTHIL,R.; PRABAKAR,K.; RAJENDRAN,L. And KAARTKIKEYAN.G. Efficacy of different biological control agents against major postharvest pathogens of grapes under room Temperature storage conditions. Phytopathol. Mediterr. Vol.50, No.1, 2011, 55-65.

40- SINGH,S.; DUREJA,P.; TANWAR,R.S. and SINGH,A. Production and antifungal activity of secondary metabolites of *TrichodermaVirens*. Pesticide Research Journal, Vol.17, No.2, 2005, 26-29.

41- SREEDEVI,B.; CHARITHA DEVI,M. And SAIGOPAL,D.V.R. Isolation and screening of effective *Trichoderma spp*. Against the root rot pathogen *Macrophominaphaseolina*. Journal of Agricultural Technology, Vol.7, No.3, 2011, 623-635.

42- TARUS,P.K.; CHHABRA,S.C.; THORUWA,C.L. and WANYONYI,A.W. Fermentation and antimicrobial activities of extracts from different species of fungus belonging to genus, *Trichoderma*. African Journal of Health Sciences, Vol.11, No.1-2, 2004, 33-42.

43- THANAABORIPAT,D.,SAPPAKITJANON,N.,PROMMI, L.and CHAREONSEONSETTASILP,S. Screening of fungi for the control of *Aspergillusparasiticus*. KMITL Sci.Tech.J.., Vol.9, No.2, 2009, 95-102.

44- WOO,S.L.; SCALA,F.; RUOCCO,M. And LORITO,m. The molecular biology of the interactions between *Trichodermaspp*. Phytopathogenic fungi and plants. Phytopathology. Vol.96, 2006, 181-185.

45- YADAV,S.L.; MISHRA,A.K.; DONGE,P.N. and SINGH,R. Assessment of fungitoxiety of phylloplanefugi against *Alternariabrassicae* causing leaf spot of mustard. Journal of Agricultural technology, Vol.7, No.6, 2011, 1823-1831.

46- ZAFARI,D.; KOUSHKI,M.M. and BAZGIR,E.Biocontrol evaluation of wheat take-all disease by *Trichoderma* screened isolates. Afr.J. Biotechnol. Vol.7, No.20, 2008, 3653-3659.