P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2015 ,(9), (3) :136-143

(*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة

Open Access

تثبيط تضاعف فايروس موزائيك الطماطة Tomato Mosaic Virus في نباتات الطماطة *Lycopersicon esculentum mill*. باستخدام فطر *Trichoderma harzianum* وراشحه المصفى بالكلوروفورم.

رجاء فاضل حمدي ساجد صلاح الدين سليم

جامعة الانبار – كلية العلوم

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: ٢٠١٣/٠٠/٠٠
تاريخ القبول: ٢٠١٤/٥/٦
تاريخ النشر: / / ٢٠٢٢

DOI: 10.37652/juaps.2015.127625

الكلمات المفتاحية:

تثبيط تضاعف ،
فايروس موزائيك الطماطة ،
الطماطة ،
Trichoderma harzianum.

الخلاصة:

اجريت هذه الدراسة لمعرفة تاثير الراشح الخام لفطر *Trichoderma harzianum* والراشح المصفى بالكلوروفورم في تضاعف فايروس موزائيك الطماطة في نباتات الطماطة واعتمدت نباتات الداتورة *Datura stramonium* كنباتات كاشفة لتقدير عدد النخرات الموضعية Local lession. اذ بينت النتائج التاثير الايجابي للراسب البروتيني في اختزال اعداد النخرات الظاهرة على اوراق نباتات الداتورة بمعدل لعدد النخرات بلغ 3.145 نخرة / سم^{٢} وبفرق معنوي كبير مقارنة بالمحلول الطافي supernatent الذي اعطى معدلا لعدد النخرات بلغ 5.236 نخرة / سم^{٢} وبفارق معنوي كبير عن معدل معاملة الداريء الفوسفاتي البالغ 7.176 نخرة / سم^{٢}.

بينت النتائج تفوق معاملة مستخلص البروتينات المرسبة من الراشح المصفى بالكلوروفورم في تثبيط تضاعف الفايروس اذ اختزلت اعداد النخرات الموضعية بمعدل بلغ 5.295 نخرة / سم^{٢} مقارنة بما اظهرته معاملتي السيطرة المتمثلة بالماء المقطر ووسط البطاطا بمعدل نخرات بلغ 8.212 و 8.333 نخرة / سم^{٢} على التوالي، فيما اعطت معاملة الراشح الخام معدلا لعدد النخرات بلغ 5.012 نخرة / سم^{٢} اذ يلاحظ تفوق معاملة الراشح الخام على معاملة المستخلص البروتيني في اختزال اعداد النخرات وتقليل تضاعف الفايروس وبفروق معنوية بينهما. كذلك افقد غلي الراشح الخام والمستخلص البروتيني فاعليتهما بدلالة غياب الفروق بين ماانتجه من نخرات موضعية مع تلك المنتجة في معاملة السيطرة (الماء المقطر ووسط البطاطا) مما يؤكد الطبيعة البروتينية للمادة الفعالة في راشح فطر *T. harzianum*. وتبين بان التركيز ١٠$^{-١}$ للراشح الخام والراشح المصفى بالكلوروفورم قد اعطى اعلى قدرة تثبيطية للفايروس بدلالة عدد النخرات الموضعية الناتجة بالسنتمتر المربع الواحد يليه التركيز ١٠$^{-٢}$ ثم التركيز ١٠$^{-٣}$ اذ يلاحظ بان هناك انخفاضا في الفاعلية التثبيطية للراشحين الخام والمصفى بشكل طردي مع درجة التخفيف ١٠$^{-٢}$ و ١٠$^{-٣}$.

المقدمة:

يعود نبات الطماطة *Lycopersicon esculentum* الى العائلة الباذنجانية Solanaceae ذو الاهمية الغذائية والاقتصادية المعروفة وتمتاز ثماره باحتوائها على المواد المضادة للاكسدة والفيتامينات والعديد من العناصر المعدنية (١ و ٢).

بلغ انتاج الطماطة في العراق لسنة ٢٠٠٨ حسب تقرير منظمة الغذاء والزراعة 830,000 طن (٣) وقدر انتاج محصول الطماطة لسنة ٢٠١١ في العراق (١٠٦٠) الف طن بنسبة مقدارها 28.3 % من مجموع انتاج مجموعة الخضراوات، اما على مستوى العراق فقدرت المساحة المزروعة لسنة ٢٠١١ ٢٤٤١٨٩ دونم، اما متوسط الانتاجية فقد بلغ ٤٣٣٩ كغم/ دونم ، اما معدل الانتاج بالطن فقد بلغ ١٠٥٩٥٣٧ طن (٤).

ومع ان محصول الطماطة يتقدم محاصيل الخضر المزروعة في العراق من حيث الانتاج والمساحة الا انه يصاب بالعديد من الامراض ومنها الامراض الفايروسية كفايروس موزائيك الطماطة

* Corresponding author at: University of Anbar / College of Science
E-mail address:

Tomato mosaic virus المؤثر على هذا الحاصل في العراق والعالم (٥، ٦). وبامكان هذا الفايروس الاستمرار بالتضاعف في النباتات المصابة ويصيب البادرات المزروعة حديثا (٧) ويسبب تدميرا للبلاستيدات الخضراء داخل الخلايا مما يسبب انخفاض في كمية الكلوروفيل في النبات كونه احد الفايروسات المسببة لاعراض الموزائيك(٨).

رغم التقارير العديدة عن استخدام بعض المركبات الكيمياوية في معالجة بعض الاصابات الفايروسية في النبات فانه لاتوجد ادلة قاطعة على نجاح هذه المركبات في تخليص النباتات المصابة من الفايروسات اذ ان اعراض الاصابة لاتلبث ان تظهر مرة اخرى على النباتات المعاملة بعد مدة من توقف المعالجة كما ان بعض هذه المركبات سامة للنبات وللانسان مما ادى الى فشلها وعدم استعمالها. لذا فقد استخدمت طرق تهدف الى الوقاية من هذه الامراض وليس معالجتها بعد حدوثها ومنها مقاومة الامراض الفايروسية (٩). ان تطوير طريقة جديدة ضروري لتقليل فايروس موزائيك التبغ لذا فان استخدام طريقة السيطرة الحيوية تعد طريقة جديدة لادارة صحة النبات خلال القرن العشرين والحادي والعشرين من خلال ايجاد طرق تقنية حيوية حديثة (١٠). اشارت بحوث عديدة الى امكانية استخدام الفطريات ورواشحها في تقليل تضاعف الفايروس، فقد توصل (١١) الى قدرة راشح فطر *Trichoderma* في اختزال الاضرار الناتجة عن فايروس موزائيك الطماطة الذي يصيب نبات الطماطة وتقليل الضرر الناتج عنه وقد استخدم الباحث نبات الداتورة كنبات كاشف.

نظرا لاهمية محصول الطماطة والاضرار الكبيرة الناجمة عن الاصابة بفايروس موزائيك الطماطة وتعدد سلالاته ولمداه العوائلي الواسع ولتحمله الظروف السيئة لسنوات عدة فقد هدفنا بهذه الدراسة تحجيم الاضرار الناتجة عن الفايروس وذلك عن طريق :

١- استحثاث المقاومة في نباتات الطماطة ضد فايروس موزائيك الطماطة باستخدام راشح فطر *Trichoderm* الخام او المصفى بالكلوروفورم.

٢- محاولة فصل المادة او المواد الفاعلة من هذه الرواشح والتي لها دور في تحفيز المقاومة.

٣- اختبار فاعلية المادة او المواد المستخلصة من هذه الرواشح تجاه فايروس موزائيك الطماطة على نباتي الطماطة والداتورة باستخدام طرائق حيوية.

المواد وطرائق العمل:

النباتات المستخدمة في البحث:

جمعت بذور الطماطة *Lycopersicon esculentum* صنف super regina من الاسواق المحلية في مدينة الرمادي في علب مختومة من شركة argeto، اما بذور نبات الداتورة *Datura stramonium* فقد جلبت من الهيئة العامة لتصديق البذور – التابعة لوزارة الزراعة.

الحصول على عزلة الفطر:

اخذت عزلة فطر *Trichoderma harzianum* من مختبر الفطريات البحثي في قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الانبار وتم تنشيط العزلة على وسط البطاطا دكستروز اكار في الحاضنة على درجة حرارة ٢٨ م° ولمدة ٥ ايام لضمان الحصول على عزلة نشطة قبل البدء بعملية تحضير الراشح الفطري المستخدم في البحث.

الحصول على عزلة فايروس موزائيك الطماطة TMV

عزل فايروس موزائيك الطماطة من نباتات تبغ مصابة تظهر عليها اعراض الاصابة بظهور نخرات موضعية على اوراقها اخذت عصارتها واستخدمت في تلقيح نباتات طماطة سليمة وبعد ظهور اعراض الاصابة عليها والمتمثلة بالموزائيك اخذت عصارتها وعوملت بدرجة حرارة ٩٠ – ٩٢ م° لمدة عشرة دقائق في حمام مائي (12) واستعملت لتلقيح اوراق نباتات داتورة والانتظار لحين ظهور الاعراض المتمثلة بالنخرات الموضعية ثم اخذت نخرة موضعية واحدة لاستخدامها في تلقيح نباتات طماطة سليمة صنف super regina وبعد ظهور اعراض الموزائيك على هذا النبات استعمل كمصدر اول للقاح فايروس موزائيك الطماطة لتلقيح نباتات كثيرة اخرى والتي استعملت مصدرا للقاح في التجارب اللاحقة.

تحضير الرواشح الفطرية :-

استخدم وسط البطاطا دكستروز السائل – Potato Dextrose Broth لتحضير راشح فطر *T. harzianum* وقسم في حاويات زجاجية نظيفة وعقم بجهاز الموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م°وضغط ١.٥ بار ولمدة نصف ساعة، ترك بعد ذلك ليبرد قليلا ثم لقح بفطر *Trichoderma* ثم وضع في حاضنة هزازة (١٥٠ دورة / دقيقة) على درجة ٢٨ م° لمدة ٧ ايام مع الاخذ بنظر الاعتبار سحب جزء من الوسط الفطري (١٠٠ مل) كل يوم(بعد مرور ٢٤ ساعة من

الزرع) وترشيحه واستخدامه كمصدر للمعاملات اللاحقة اثناء مدة التجربة، وذلك بعمر يوم وبعمر يومين وثلاثة ايام الى اليوم السابع، رشح بعدها باستخدام ورق ترشيح نوع watman No1 للتخلص من الكتلة الحية للفطر واخذ الوسط المرشح لاستخدامه في اختبار امكانية تحفيز المقاومة في النباتات في التجارب اللاحقة وقد سمي الوسط الفطري بالراشح الفطري الخام (crud filtrate) (13).

طريقة تحضير لقاح فايروس موزائيك الطماطة:-

سحق ١ غم من اوراق نباتات طماطة ملقحة بفايروس موزائيك الطماطة والتي ظهرت عليها اعراض الاصابة في هاون خزفي مع ٥ مل من محلول داريء فوسفاتي Na2HPO4 بتركيز ٠.٠١% ذو رقم هيدروجيني ٧ ومبرد (١٤)، رشحت العصارة الناتجة خلال ٤ طبقات من الشاش الطبي وعرض الراشح للانتباذ بجهاز الطرد المركزي centerfuge اهمل بعدها الراسب وجمع الرائق في قناني زجاجية وبواقع ٢ مل في كل حاوية ثم حفظت في المجمدة لتكون مصدر للقاح الفايروسي المستعمل في التجارب اللاحقة.

عملية التلقيح الميكانيكي:-

بعد تحضير اللقاح الفايروسي من النبات المصاب والمذكور في الفقرة السابقة، نثر طبقة خفيفة من الكاربوراندوم carborundum 400 mesh على الاوراق المراد تلقيحها باستخدام ناشر Automizer اعد لهذا الغرض، وغمس اصبع السبابة من اليد اليمنى في اللقاح ومسح سطح الورقة بضغط خفيف ويفضل ان تسند الورقة من الاسفل بواسطة راحة الكف اليسرى وبعد الانتهاء من التلقيح غسل سطح الورقة بالماء مباشرة لفترة قصيرة لاتتجاوز العشرون ثانية (٩ و١٤).

حساب مساحات الاوراق الملقحة:-

رسمت الورقة الملقحة والمراد معرفة مساحتها على ورقة بيانية وقد اخذ بنظر الاعتبار الاستفادة من المربعات الكاملة والمنقوصة التي تشغلها صورة الورقة الملقحة على الورقة البيانية لحساب مساحة الورقة وحسب القانون الاتي:-

مساحة الور قة = عدد المربعات الكاملة + عدد المربعات المنقوصة / ٢(١٥).

تحضير التربة وزراعة النباتات:-

زرعت بذور الداتورة والطماطة في باديء الامر باستخدام فلينة الانبات المعبأة بمادة البتموس المعقمة، وبعد ظهور البادرات نقلت الى سنادين ذات قطر علوي ٨ سم وقطر سفلي ٦ سم وارتفاع ١٠ سم والتي غسلت بصورة جيدة بالماء والهايبوكلورايت التجاري بتركيز ٦ % ثم بوفرة من الماء لازالة اثار المنظفات المستخدمة وملئت بتربة مؤلفة من البيتموس peat moss والرمل بنسبة ٢ : ١ عقمت بجهاز الموصدة Autoclave على درجة حرارة ١٢١ م° وتحت ضغط ١.٥ بار ولمدة ٤٥ دقيقة على الاقل وتركت لمدة اسبوع قبل استخدامها في الزراعة، نميت النباتات في بيت بلاستيكي اعد خصيصا لهذا الغرض وكان بارتفاع ٢ متر وطول ٤ متر وعرض ٣ متر.

سقيت النباتات بالماء حسب الحاجة وسمدت بمحلول السماد التجاري المركب N.P.K. وبتركيز ٣ غم / لتر من الماء وبواقع ثلاث سقيات كل اسبوعين (١٦) وقد استخدم المبيد الحشري الفاسايبرمثرين ١٠% لمكافحة الحشرات كل اسبوع على الاقل.

استعمال مادة الكلوروفورم في تصفية الراشح الفطري لفطر *T. harzianum*.

اعتمدت طريقة(١٧) في تصفية راشح فطر *T. harzianum* ومن ثم اختبر على النباتات، وذلك عن طريق مزج الراشح الفطري وبنسبة ١ حجم كلوروفورم : ٢ حجم راشح فطري في قناني زجاجية محكمة وتركت لمدة يوم واحد على جهاز المحرك المغناطيسي magnetic stirrer لاتمام عملية المزج بصورة صحيحة، تُرك المزيج بدون تحريك للحصول على طبقتين العليا منها سميت بالراشح المصفى بالكلوروفورم والسفلية سميت بطور المذيب (الكلوروفورم) وفصلت الطبقتين في دوارق زجاجية وتركت الحاوية منها على الراشح المصفى بالكلوروفورم مفتوحة في جو المختبر للتخلص من بقايا الكلوروفورم بعدها حفظت في المجمدة لاستعمالها في التجارب اللاحقة.

طريقة ترسيب البروتين من الراشح المصفى بالكلوروفورم لفطر *Trichoderma* باستعمال محلول كبريتات الامونيوم

اتبعت طريقة (١٤) لغرض ترسيب المواد البروتينية باستعمال محلول كبريتات الامونيوم، اذ مزج حجم واحد من الراشح المصفى بالكلوروفورم مع حجم واحد من المحلول المشبع بكبريتات الامونيوم وترك المزيج لمدة ٢٤ ساعة في الثلاجة، بعدها عرض للانتباذ بسرعة ٥٠٠٠ دورة / دقيقة لفصل الراسب عن الراشح، اهمل الراشح وتمت اذابة الراسب في داريء فوسفاتي 0.01M وعرض المحلول الناتج للانتباذ لازالة المواد غير الذائبة ثم اخذ المحلول الراشح ووضع في اكياس ديلزة للانفاذ ضد الماء المقطر لمدة ٢٤ ساعة مع

الاخذ بنظر الاعتبار تبديل الماء مرات عدة خلال عملية الديلزة، بعدها اخذ المحلول واستخدم في التجارب اللاحقة.

اختبار تاثير المواد البروتينية المرسبة من الراشح المصفى بالكلوروفورم في فاعلية فايروس موزائيك الطماطة

اختيرت نباتات داتورة متجانسة بعمر الورقة الرابعة ومسحت انصاف اوراقها بالمحلول الطافي الناتج من عملية الديلزة وتركت لمدة يوم واحد ثم لقحت الانصاف المقابلة بفايروس موزائيك الطماطة وبواقع خمسة مكررات (انصاف اوراق)، اما معاملة السيطرة فقد تضمنت مسح انصاف اوراق الداتورة بالداريء الفوسفاتي او بالماء المقطر ولقحت الاوراق المقابلة بالفايروس بعد يوم واحد من المسح التحفيزي بالداريء او بالماء المقطر. وبعد مرور ٨ – ١٠ يوم تم حساب عدد النخرات الموضعية الناتجة وكررت التجربة مرتين.

تاثير راشح فطر *Trichoderma* والبروتين المرسب من الراشح المصفى بالكلوروفورم في تثبيط حدوث الاصابة بالفايروس في اوراق نبات الداتورة

لغرض مقارنة تاثير البروتين المرسب من الراشح المصفى بالكلوروفورم والذي تم تعريضه للانفاذ ضد الماء المقطر مع تاثير الراشح الخام لفطر *Trichoderma* مسحت انصاف اوراق نباتات الداتورة بصورة منفردة بالمستحضرين المشار اليها وبعد مرور يوم من المسح التحفيزي بالمستحضرين لقحت الانصاف المقابلة بفايروس موزائيك الطماطة وبواقع خمسة مكررات وبعد مرور ٨ – ١٠ ايام تم حساب عدد النخرات الموضعية الناتجة في السنتمتر المربع الواحد من الورقة وكررت التجربة مرتان.

تاثير الغلي في الفاعلية التثبيطية لراشح فطر *T. harzianum* وفي البروتين المرسب من الراشح المصفى بالكلوروفورم (بفعل كبريتات الامونيوم)

عرض الراشح الخام لفطر *T. harzianum* والبروتينات المرسبة بفعل كبريتات الامونيوم لدرجة حرارة ١٠٠م° في حمام مائي ولمدة ١٠ دقائق (١٨) بعدها بُرد المستحضران واختبر تاثيرهما التثبيطي من خلال مزج احجام متساوية كلا على انفراد مع اللقاح الفايروسي وترك لمدة ساعة على الاقل ثم لقحت به اوراق نباتات داتورة بواقع خمسة مكررات لكل معاملة، اما معاملة السيطرة فقد تمثلت بمزج اللقاح الفايروسي مع الماء المقطر او وسط البطاطا السائل وبالطريقة نفسها المذكورة انفا.

تاثير تخفيف كل من الراشح الخام والراشح المصفى بالكلوروفورم لفطر *Trichoderma* على فعاليتهما التثبيطية في اوراق الداتورة.

حضرت التخافيف 10^{-1} و 10^{-2} و 10^{-3} من الراشح الفطري الخام والراشح المصفى بالكلوروفورم باستخدام الماء المقطر.

مزجت احجام متساوية من التخافيف المحضرة كلا على حدة مع لقاح فايروس موزائيك الطماطة وتركت لمدة ساعة واحدة قبل استعمالها في تلقيح انصاف اوراق داتورة وبواقع ٥ مكررات لكل معاملة. وبعد مرور ٨ – ١٠ ايام تم حساب عدد النخرات الموضعية الناتجة / سم^2 من مساحة الورقة الملقحة.

النتائج :

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي للبيانات المدرجة في الجدول رقم ١ والتي تمثل نتائج تكرار ثلاث تجارب لمعرفة تاثير المواد المترسبة من الراشح المصفى بالكلوروفورم بفعل المحلول المشبع من كبريتات الامونيوم، اذ بينت النتائج التاثير الايجابي للراسب البروتيني في اختزال اعداد النخرات الظاهرة على نباتات الداتورة اذ اعطت معدلا لعدد النخرات بلغ 3.145 نخرة / سم^2 وبفرق معنوي كبير مقارنة بالمحلول الطافي الذي اعطى معدلا لعدد النخرات بلغ 5.236 نخرة / سم^2 (شكل١). وان كلتا المعاملتين المتمثلة بالراسب البروتيني والمحلول الطافي الناتج من عملية الديلزة قد اختزلت اعداد النخرات بشكل معنوي مقارنة مع معاملتي الداريء الفوسفاتي ومعاملة الماء المقطر (السيطرة) اذ اعطت معدلا لعدد النخرات بلغ 7.176 نخرة/ سم^2 و7.461 نخرة / سم^2 على التوالي.

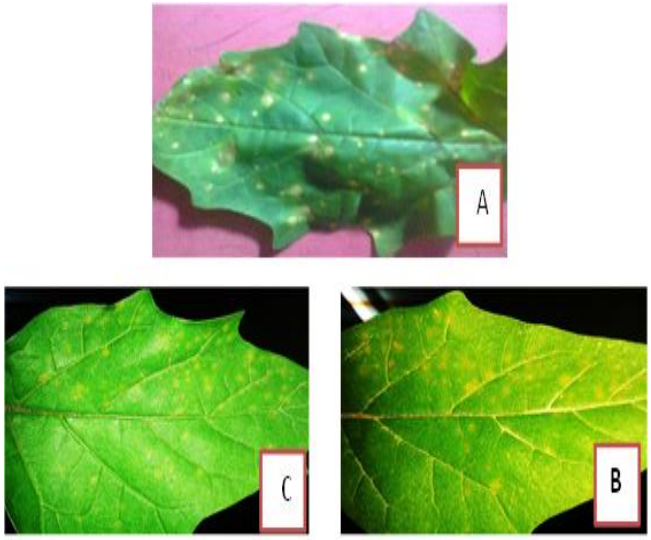
جدول رقم ١ : اختبار تاثير المواد البروتينية المرسبة من الراشح المصفى بالكلوروفورم والمحلول الطافي في فاعلية فايروس موزائيك الطماطة بدلالة اعداد النخرات الناتجة.

رقم التجربة	عدد النخرات / سم^2				
	الراسب (بروتين)	الطافي	داريء الفوسفات	ماء مقطر	المعدل
١	3.167 d	5.290 c	7.194 b	7.461 a	5.778 A
٢	3.133 d	5.181 c	7.117 b	7.509 a	5.735 A
٣	3.134 d	5.236 c	7.218 b	7.411 ab	5.750 A
المعدل	3.145 D	5.236 C	7.176 B	7.461 A	

الارقام تمثل متوسطات خمسة مكررات.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2015 ,(9), (3) :136-143

المتوسطات متشابهة الحروف الصغيرة لاتختلف عن بعضها معنويا وحسب اختبار اقل فرق معنوي المعدل (L.S.D.) وعلى مستوى معنوية 0.05 .
المتوسطات متشابهة الحروف الكبيرة عموديا وافقيا لاتختلف عن بعضها معنويا وحسب اختبار اقل فرق معنوي (L.S.D.) وعلى مستوى معنوية 0.05



شكل رقم ١ : اوراق نباتات داتورة معاملة بالراسب البروتيني والمحلول الطافي الناتج من عملية الديلزة.

A – ورقة نبات داتورة كمعاملة سيطرة.

B – ورقة نبات داتورة معامل بالراسب البروتيني لراشح فطر *Trichoderma* C. – ورقة نبات داتورة معاملة بالمحلول الطافي لراشح الفطر.

تفوقت معاملة الراشح الخام لفطر *T. harzianum* على معاملة المستخلص البروتيني وبفارق معنوي في اختزال اعداد النخرات اذ اعطت معاملة الراشح الخام معدلاً لعدد النخرات بلغ 5.012 نخرة/سم^{٢} وبنسبة تثبيط بلغت 39.85% في حين اعطت معاملة المستخلص البروتيني معدل عدد نخرات بلغ 5.295 نخرة/سم^{٢} وبنسبة تثبيط بلغت 36.45 % وان كلتا المعاملتين تفوقت معنوياً على معاملتي السيطرة المتمثلة بوسط البطاطا والماء المقطر التي اعطت معدلاً لعدد النخرات بلغ 8.333 و 8.212 نخرة/سم^{٢} على التوالي(جدول٢).

وتشير النتائج المعروضة في الجدول رقم ٣ غياب الفروق المعنوية بين تاثير كل من الراشح الخام والمستخلص البروتيني اللذين تم تعريضهم لدرجة حرارة ١٠٠م° في حمام مائي ولمدة ١٥ دقيقة ومعاملة السيطرة المتمثلة بالماء المقطر ووسط البطاطا مما يدل على ان الحرارة العالية قد عملت على فقدان كلا المستحضرين لتاثيرهما التثبيطي لفايروس موزائيك الطماطة والذي قد يؤكد الطبيعة البروتينية للمادة الفعالة في راشح فطر *T. harzianum* .

جدول رقم ٢ : اختبار قدرة المستخلص البروتيني والراشح الخام في تثبيط حدوث الاصابة في اوراق نبات الداتورة بدلالة اعداد النخرات الناتجة.

رقم التجربة	عدد النخرات الموضعية / سم^{٢}				
	المعاملة				
	مستخلص بروتيني	الراشح الخام	وسط البطاطا	ماء مقطر	المعدل
١	5.339 b	5.034 c	8.390 a	8.154 a	6.729 A
٢	5.272 bc	5.041 c	8.287 a	8.183 a	6.696 A
٣	5.274 bc	4.962 c	8.321 a	8.299 a	6.714 A
المعدل	5.295 B	5.012 C	8.333 A	8.212 A	

الارقام تمثل متوسطات خمسة مكررات.
المتوسطات متشابهة الحروف الصغيرة لاتختلف عن بعضها معنويا وحسب اختبار اقل فرق معنوي المعدل (L.S.D.) وعلى مستوى معنوية 0.05 .
المتوسطات متشابهة الحروف الكبيرة عموديا وافقيا لاتختلف عن بعضها معنويا وحسب اختبار اقل فرق معنوي المعدل (L.S.D.) وعلى مستوى معنوية 0.05 .

جدول رقم ٣ : تاثير الغلي على الفاعلية التثبيطية لراشح فطر *Trichoderma* وعلى البروتين المرسب من الراشح المصفى بالكلوروفورم بفعل كبريتات الامونيوم.

رقم التجربة	عدد النخرات / سم^{٢}				
	المعاملة				
	مستخلص بروتيني	راشح خام	ماء مقطر	وسط البطاطا	المعدل
١	6.849 ab	6.751 b	6.780 b	6.787 b	6.791 A
٢	6.805 a	6.788 b	6.777 b	6.780 b	6.787 A
٣	6.822 ab	6.797 b	6.803 b	6.774 ab	6.799 A
المعدل	6.825 A	6.778 A	6.786 A	6.780 A	

الارقام تمثل متوسطات خمسة مكررات.
المتوسطات متشابهة الحروف الصغيرة لاتختلف عن بعضها معنويا وحسب اختبار اقل فرق معنوي المعدل (L.S.D.) وعلى مستوى معنوية 0.05.

بينت النتائج المعروضة في الجدول رقم ٤ تاثير التخفيف العشري للراشح الخام والراشح المصفى بالكلوروفورم لفطر *Trichoderma* في تثبيط تضاعف فايروس موزائيك الطماطة، اذ تشير النتائج بان التركيز ١٠$^{-١}$ للراشح الخام والراشح المصفى بالكلوروفورم قد اعطى اعلى قدرة تثبيطية للفايروس كما موضح بالجدول بدلالة عدد النخرات الموضعية الناتجة بالسنتمتر المربع الواحد يليه التركيز ١٠$^{-٢}$ ثم التركيز ١٠$^{-٣}$ اذ يلاحظ بان هناك انخفاضا في الفعالية التثبيطية للراشحين الخام والمصفى بشكل طردي مع درجة التخفيف ١٠$^{-٢}$ و ١٠$^{-٣}$.

يلاحظ من خلال المعدل العام للراشح الخام والراشح المصفى بالكلوروفورم للفطر *Trichoderma* بان عدد النخرات اختزلت وبشكل

معنوي مقارنة مع معاملة السيطرة المتمثلة بالماء المقطر ووسط البطاطا، اذ اعطت معاملة الراشح الخام معدل عدد نخرات بلغ 0.52 نخرة / سم^{2} والراشح المصفى بالكلوروفورم 0.54 نخرة / سم^{2} مقارنة بالماء المقطر ووسط البطاطا السائل الذي اعطى معدل عدد نخرات بلغ 958 و 9.95 نخرة / سم^{2} على التوالي.

جدول رقم ٤ : تاثير التخفيف العشري للراشح الخام والراشح المصفى بالكلوروفورم في تثبيط تضاعف فايروس موزائيك الطماطة.

نوع الراشح	عدد النخرات الموضعية / سم^{2} التخفيف			
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	المعدل
الراشح الخام لفطر *trichoderma*	0.23 b	0.44 b	0.89 b	0.52 B
الراشح المصفى بالكلوروفورم لفطر *trichoderma*	0.25 b	0.49 b	0.88 b	0.54 B
ماء مقطر	10.09 a	9.13 a	9.51 a	9.58 A
وسط البطاطا	10.02 a	9.09 a	9.53 a	9.95 A
المعدل	5.15 A	4.78 B	5.21 A	

الارقام تمثل متوسطات خمسة مكررات.

المتوسطات متشابهة الحروف الصغيرة لاتختلف عن بعضها معنويا وحسب اختبار اقل فرق معنوي المعدل (L.S.D.) وعلى مستوى معنوية 0.05.

المتوسطات متشابهة الحروف الكبيرة عموديا وافقيا لاتختلف عن بعضها معنويا وحسب اختبار اقل فرق معنوي المعدل (L.S.D.) وعلى مستوى معنوية 0.05.

مستوى معنوية 0.05 .

المتوسطات متشابهة الحروف الكبيرة عموديا وافقيا لاتختلف عن بعضها معنويا وحسب اختبار اقل فرق معنوي المعدل (L.S.D.) وعلى مستوى معنوية 0.05

بينت العديد من الدراسات ان اصابة النبات بفايروس موزائيك الطماطة قبل عملية الغمر بالرواشح الفطرية قد حفز النمو وانتاج Chitinases و ß-1-3- glucanases جنبا الى جنب مع دور الراشح الفطري في اختزال اعداد النخرات ومساحة النخرات عند غمر النباتات بهذه الرواشح بعد التلقيح بالفايروس.

وجد بان مادة Trichokonins المعزولة من فطر *Trichoderma* تستطيع تحفيز المقاومة الجهازية واليات الدفاع في نباتات التبغ ضد فايروس موزائيك الطماطة، اذ استطاعت هذه المادة من تثبيط عدد النخرات الى ٥٤% (١٩)، اذ تعمل هذه المادة على تحفيز المركبات الفينولية في النبات وتزيد من فعالية الانزيمات المتعلقة بالامراضية مثل Phenylalanine ammonia layase (PAL) و Peroxidase (POD) و Polyphenyle oxidase (PPO) المسؤولة عن الجينات الدفاعية في الخلية النباتية بالمقارنة مع نباتات السيطرة، وان المعاملة بمادة Trichokonins يحث على زيادة الاوكسجين المتفاعل والبروتينات وبيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) في اوراق التبغ بعد معاملة اوراق التبغ في ١٠٠ nM من محلول Trichokonins لمدة ٤ ايام (20) اذ ان PAL و PPO و POD من الانزيمات المهمة المتعلقة بالدفاع(٢١).

تبين من خلال نتائج الجدول رقم ١ بان الراسب البروتيني قد اختزل اعداد النخرات وبصورة معنوية عن المحلول الطافي وعن معاملة السيطرة المتمثلة بالماء المقطر والداريء الفوسفاتي اذ اعطت معاملة الراسب البروتيني معدلا عاما لعدد النخرات بلغ 3.145 نخرة / سم^{2} مقارنة مع المحلول الطافي الذي اعطى معدلا لعدد النخرات بلغ 5.236 نخرة / سم^{2} وهذه النتيجة توضح اهمية البروتينات الموجودة في الراشح في اختزال اعداد النخرات.

ويبين الجدول رقم ٢ بان راسب البروتينات قد اعطى نسبة تثبيط بلغت 36.45 % اما الراشح الخام فقد اعطى نسبة تثبيط بلغت 39.85 % مما يدعو الى الاعتقاد بان الراشح الخام قد يحتوي على مواد اخرى مثبطة للفايروس فضلا عن وجود البروتينات والذي يعتبر المثبط الاساسي لتضاعف الفايروس.

ان غياب الفروق المعنوية بين المعدلات العامة للمستخلص البروتيني والراشح الخام بالمقارنة مع السيطرة (جدول ٣) يدل على ان المادة المثبطة هي ذات طبيعة بروتينية اذ ادى غلي الراسب البروتيني والراشح الخام الى فقدان تاثيرهما في اختزال اعداد النخرات لذلك لم تظهر بينهما وبين معاملة المقارنة اي فروق معنوية اذ ادت عملية الغلي الى تشويه البروتين وفقدان خصائصه في تثبيط الفايروس وهذه النتيجة تتفق مع ماوجده (١٤) عندما اوضح بان غلي المستخلص الخام لنبات الرغيلة وراسبه البروتيني ادى الى انعدام فاعليتهما في تثبيط تضاعف فايروس موزائيك الطماطة مما يؤكد تاثير الغلي على البروتين المسبب للتثبيط وادى الى تشويه تركيب المادة البروتينية.

يبين الجدول ٤ بان تخفيف الراشح الفطري الخام والراشح الفطري المصفى بالكلوروفورم ادى الى زيادة في عدد النخرات كلما زادت نسبة التخفيف مما يدل على انخفاض المادة المثبطة (البروتينات) ابتداءا من التخفيف 10^{-1} وصولا الى التخفيف10^{-3} مما اثر على فعاليتها سواءا في الراشح الخام او الراشح المصفى بالكلوروفورم وكانت

الفروقات معنوية بينهما وبين معاملة السيطرة المتمثلة بالماء المقطر ووسط البطاطا.

المصادر:

١ - شريف، جنور هادي. ٢٠٠٤. استجابة بعض اصناف الطماطة للمسافات الزراعية ومستويات النايتروجين في منطقة السليمانية. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، الجامعة المستنصرية.

٢- الاسود، ماجد بشير، عمر فوزي و امجد بويا. ٢٠٠٠. مباديء الصناعات الغذائية. مطبعة جامعة الموصل ص ٢٢.

3- FAO. 2008. List of countries by tomato production.

٤ - مديرية الاحصاء الزراعي، الجهاز المركزي للاحصاء. وزارة التخطيط. ٢٠١٢. انتاج المحاصيل والخضراوات لسنة ٢٠١١. ص ١٠.

5- Duart, K.R.; H.luiz and C. A. Flavio.2001. Monoclonal antibodies to identify tomato mosaic tobamovirus. Braz. J. microbial. 32: 240 – 242.

٦ - الجيرو، اناهيد وعد الله. ٢٠١٠. دراسات تشخيصية على بعض فايروسات الطماطة في محافظة نينوى، اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل.

7- Gulser. D, Yllmaz NK, Candemir, F. 2008. Accumulation of Tobacco mosaic virus (TMV) at different depths clay and loamy sand textural soils due to tobacco waste Application. Environ. monit. Assess 146: 235 - 242.

8- Hull, J. 2002. Matthews plant virology. Academic press 1001 pp.

٩- شوكت، عبد اللطيف بهجت .١٩٨٢. فايروسات النبات، خصائصها، الامراض التي تسببها، مقاومتها. مطابع مديرية دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل.

10- Cook, RS. 2000. Advances in plant health management in the 20th century. Annu. Rev. phytopathol. 38: 95 – 116.

11- Megahed, A. A.; Kh. A. El - Dougdoug; B. A. Othman; S. M. Lashin; M. A. Ibrahim and A. R. Sofy. 2013. Induction of resistance in tomato plants against Tomato mosaic tobamovirus using beneficial microbial isolates. Pakistan Journal of biological sciences, 16 (8): 385 – 390.

12- Zaitlin. M. and H.W. Israel. 1975. Tobacco mosaic virus type strain C.M.I. / A.A.B. Description of plant viruses, No. 151.

13- Chambers, S.M. and E. S. Scott. 1995. In vitro antagonism of phytophthora cinnamomi and P. citricola by isolates of Trichoderma sp.and Gliocladium virens. J. phytopathol 143: 471 – 477.

١٤- السعيدي، ساجد صلاح الدين سليم. ٢٠٠٤. تحفيز المقاومة في نباتات الطماطة Lycopersicon esculentum Mill ضد الاصابة بفايروس موزائيك الطماطة Tomato Mosaic Virus عن طريق مستخلصات نباتية. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.

١٥- فليحة، احمد نجم الدين وجميل نجيب عبد الله. ١٩٨٧. علم الخرائط والدراسة الميدانية. الطبعة الثانية. مطبعة العاني، بغداد.

١٦- قاشا، فاضل يوسف عبو. ١٩٨٨. تحفيز المقاومة المكتسبة ضد فايروس موزائيك التبغ في اوراق التبغ غير الملقحة بالفايروس. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة صلاح الدين.

17- Wilson, E.G. 1998. Medical plant analysis. Academic press, New York. Vol. 2, p. 192.

18- Simons, N. John., R, Swidler., and L.M. Moss. 1963. Succulent type plants as sources of plant virus inhibitors. Phytopathology, 35: 677 – 683.

19- Chen YF, Zhau Y, Zhao XM, Guo P, An HL, Du YG. Han YR, Liu H and Zhang YH. 2009. Functions of oligochitosan induced protein kinase in Tobacco mosaic virus resistance and pathogenesis related proteins in Tobacco. Plant physiol bioch 47: 724 – 731.

20- Yan luo, D.D. Zhang, X.W. Dong, PB. Zhao, L.L. Chen, XY. Song, X.J. Wang, X.L. Chen, Mei, S. and YZ., Zhang. 2010. Antimicrobial peptaibols induce defence responses and systemic resistance in tobacco against tobacco mosaic virus. Lab of microbial Technology, marine biotechnology research center, Shandong university. FEMS microbial let 313. P 120 – 126.

21- Sticher, L.; Mauch – mani, B. and metraux, JP. 1997. Systemic acquired resistance. Ann Rev phytopathol 35: 235 – 270.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2015 ,(9), (3) :136-143

Inhibition of Tomato Mosaic Virus replication in tomato plant *Lycopersicon esculentum* by *Trichoderma harzianum mill* fungi and its supernatant which filteration with chlorophorm.

Raja Fadhil Hamdi **Sajid Salahuddin Saleem**

E.mail:

Abstract:

The study was conducted to know the effect of crud filtrate of *T. harzianum* and its supernatant which screened with chlorophorm in replication of Tomato mosaic virus in tomato plant *Lycopersicon esculentum* and relied *Datura stramonium* plants as indicator plant to determind the number of local lesion, the results showed the positive effect of protein sediments in reduce the number of local lesion in *Datura* plants which which gave 3.145 lession/ cm^2 while supernatant gave 5.236 lession/ cm^2 and phosphate buffer treatment gave 7.176 lession/ cm^2 .The results showed that the treatment of sidements proteins from supernatant which filtrate with chlorophorm reduced the number of local lesion with rate 5.295 lession/ cm^2 compared with two control treatment (water, potato media) which gave 8.212, 8.333 lession/ cm^2 respectivly, while the crud filtrate treatment gave rate 5.012 lession/ cm^2 , that mean, the treatment of crud filtrate succese to reduce the number of lesion and reduced the virus replication comparison with protein extract. Also, boiling the crud filtrate and protein extract led to losing the activity of both treatments, because the protein substances lost there inhibition activity when they exposed to high heat degree.The concentration 10^{-1} for crud filtrate and its filtrate screening with chlorophorm gave the grate effect in inhibition the virus in cm^2 then the concentration 10^{-2} then 10^{-3} .