P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2015 ,(9), (3) :01-10

(JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة

Open Access

استخدام منتجات الايض الثانوي للفطرين *Trichoderma* و *Aspergillus* في تحفيز مقاومة نباتات الطماطة *Lycopersicon esculantum* ضد الاصابة بفايروس موزائيك الطماطة Tomato Mosaic Virus.

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.2015.127551

الكلمات المفتاحية:
الايض الثانوي ،
Trichoderma ،
Aspergillus ،
تحفيز مقاومة ،
الطماطة ،
فايروس موزائيك الطماطة.

الخلاصة:

اجريت هذه الدراسة لمعرفة الفعالية التثبيطية لراشحي الفطرين *Trichoderma harzianum* و *Aspergillus wenti* فضلاً عن حامض السالسيك (تركيز 0.01) عند خلطها مع فايروس موزائيك الطماطة وبشكل منفصل وتلقيح اوراق نبات الداتورة بهذه الخلائط، فضلا عن دراسة امكانية تحفيز المقاومة في النباتات عند معاملتها برواشح الفطرين وبشكل منفصل، واعتمد على عدد النخرات كمؤشر على حيوية الفايروس. اظهرت النتائج بان عدد النخرات لراشح فطر *T. harzianum* اخذت بالانخفاض كلما زاد عمر الراشح من يوم الى اليوم السادس، اذ اعطى راشح اليوم السادس اقل عدد نخرات اذ بلغ 2.971 نخرة/سم^2 مقارنة مع بقية المدد ومع معاملة السيطرة التي اعطت عدد نخرات بلغ 10.085 نخرة/سم^2 للماء المقطر و 9.982 نخرة / سم^2 لوسط البطاطا وبفارق معنوي وبالمقارنة مع معاملة حامض السالسيلك، كان راشح اليوم السادس للفطر *T. harzianum* الاكفأ في تثبيط تضاعف الفايروس على الرغم من عدم وجود فرق معنوي واضح، وكذلك الحال في معاملة راشح فطر *A. wenti* الذي اختزلت فيها عدد النخرات مع زيادة عمر الراشح ابتداءاً من اليوم الاول الى اليوم السادس اذ اعطى اقل قيمة لعدد النخرات (4.580 نخرة/سم^2) وبفارق معنوي مع معاملة السيطرة المتمثلة بالماء المقطر ووسط البطاطا، لذلك استخدم راشح اليوم السادس في التجارب اللاحقة من هذا البحث. ان خلط تراكيز متدرجة من الراشح الفطري (بعمر ستة ايام) مع اللقاح الفايروسي قد اعطى نتائج متفاوتة مقارنة مع معاملة السيطرة، اذ كان التركيز ٥٠% من راشح الفطرين الاكفأ في اختزال اعداد النخرات وتثبيط تضاعف فايروس موزائيك الطماطة مقارنة مع بقية التراكيز ومع معاملة السيطرة. اذ اعطى الراشح الخام لفطر *T. harzianum* بتركيز ٥٠% اعلى نسبة تثبيط 61.713% (عدد النخرات 3.795 نخرة/سم^2) يليه راشح فطر *A.wenti* بنسبة تثبيط 57.871 (عدد النخرات 4.014 نخرة/سم^2). اشارت الدراسة الى ان رش نباتات الطماطة براشحي الفطرين *T. harzianum* و *A.wenti* او حامض السالسيلك كل على انفراد تحفز مقاومة نباتات الطماطة بدلالة انخفاض عدد النخرات الموضعية الناتجة عند التلقيح بفايروس موزائيك الطماطة، وقد كان الفطر *T. harzianum* الاكثر فاعلية في تثبيط الفايروس مع ازدياد عدد الرشات وصولا الى الرشة الثامنة وبنسبة تثبيط بلغت 45.185 % في حين اعطى الفطر *A. wenti* نسبة تثبيط بلغت 43.072%. وان غمر سويقات اوراق الطماطة في راشح فطر *T. harzianum* بعد تلقيحها بالفايروس لمدة يوم واحد قد ادى الى تثبيط تضاعف الفايروس في الورقة الملقحة والذي ادى الى اختزال عدد النخرات الظاهرة اذ بلغت نسبة التثبيط 65.782% (عدد النخرات 2.373 نخرة/سم^2) وبلغت نسبة التثبيط لراشح فطر *Aspergillus* 52.357% (عدد النخرات 3.304نخرة/سم^2).

المقدمة:

تصاب نباتات الطماطة بفايروس موزائيك الطماطة ويسبب خسائر اقتصادية لهذا المحصول تصل الى ٢٥% من الحاصل، وتختلف نسبة الخسارة حسب حساسية الصنف والظروف البيئية وحسب سلالة الفايروس (١) ويسبب فايروس موزائيك الطماطة خسائر لمحصول الطماطة في الحقل والبيت الزجاجي وينتشر عليها بشكل وبائي خاصة في البيوت البلاستيكية والزجاجية، بالرغم من التقارير العديدة عن استخدام بعض المركبات الكيميائية في معالجة بعض الاصابات الفايروسية في النبات فانه لاتوجد ادلة قاطعة على نجاح هذه المركبات في تخليص النباتات المصابة من الفايروسات كما ان بعض هذه المركبات سامة للنبات وللانسان مما يؤدي الى فشلها وعدم استعمالها (٢). لذلك استخدمت طرق عديدة للتخلص من الفايروس ومنها استخدام منتجات الايض الثانوي لبعض الفطريات ومنها فطر *Trichoderma* و *Aspergillus* لتثبيط تضاعف فايروس موزائيك الطماطة على هذا المحصول المهم اقتصاديا، اذ ان تطوير طريقة جديدة ضروري لتقليل فايروس موزائيك الطماطة لذا فان استخدام طريقة السيطرة الحيوية تعد طريقة جديدة لادارة صحة النبات خلال القرن العشرين والحادي والعشرين من خلال ايجاد طرق تقنية حيوية حديث(٣).

يعد فطر *Trichoderma* sp. من الفطريات غير الممرضة والموجودة في المنطقة المحيطة بالجذر، يعمل هذا الفطر على كبح نمو الممرضات في التربة باليات عدة من خلال انتاج طيف واسع من منتجات الايض الثانوي والتنافس مع الممرض على مصادر الغذاء والمكان وتحفيز المقاومة وانتاج انزيمات ال Protease والانزيمات المحطمة لجدار خلية الفطر (٤).ان انواع فطر *Trichoderma* حرة المعيشة وتتواجد في التربة وعلى الجذور النباتية ومعروفة منذ زمن بعيد بانتاجها لطيف واسع من المواد المضادة الحيوية antibiotic (٥).

وفطر *Aspergillus* sp. من الفطريات المهمة في مكافحة العديد من الامراض النباتية، اذ ان المستخلص الفطري لفطر *Aspergillus* له فاعلية تثبيطية ضد فايروس موزائيك الطماطة، اذ وجد ان لمركبات asperxanthone و asperbiphenyl فاعلية تثبيطية لتضاعف فايروس موزائيك الطماطة (6)، ويعد فطر *Aspergillus niger* احد الانواع المعروفة و المستخدمة بشكل واسع في عمليات التقانة الحيوية (٧).

لذلك يهدف البحث الى ايجاد طريقة مناسبة للتخلص من فايروس موزائيك الطماطة وتقليل تضاعفه في النبات لتقليل خسائره الاقتصادية على محصول الطماطة باستخدام منتجات الايض الثانوي لفطري *T.harzianum* و *A. wenti* وبعيدا عن المواد الكيميائية المضرة للبيئة والمسببة للامراض في الانسان.

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 الداتورة فقد جلبت من الهيئة العامة لتصديق البذور – التابعة لوزارة الزراعة.

الحصول على العزلات الفطرية :

اخذت عزلة فطر T. harzianum و A. wenti من مختبر الفطريات البحثي في قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الانبار وتم تنشيط العزلات على وسط البطاطا دكستروز اكار في الحاضنة على درجة حرارة ٢٨م° 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 (8)، استعملت العصارة لتلقيح اوراق نباتات داتورة والانتظار لحين ظهور الاعراض المتمثلة بالنخرات الموضعية ثم اخذت نخرة موضعية واحدة لاستخدامها في تحضير لقاح الفايروس وتلقيح نباتات طماطة سليمة صنف super regina وبعد ظهور الاعراض على هذه النباتات استعملت كمصدر اول للقاح فايروس موزائيك الطماطة لتلقيح نباتات كثيرة اخرى والتي استعملت مصدرا للقاح في التجارب اللاحقة.

تحضير الرواشح الفطرية :-

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

استخدم لتحضير راشح فطر *T. harzianum* . و *A. wenti* وسط البطاطا دكستروز السائل Potato – Dextrose Broth 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 بالفطرين *T. harzianum* و *A.wenti* كلا على انفراد وحضنت في حاضنة هزازة على درجة ٢٨ م° لمدة ٧ ايام مع الاخذ بنظر الاعتبار سحب جزء من الوسط الفطري (١٠٠مل) كل يوم (بعد مرور ٢٤ ساعة من الزرع) ولكلا الفطرين وترشيحه واستخدامه كمصدر للمعاملات اللاحقة اثناء مدة التجربة، وذلك بعمر يوم اوبعمر يومين اوثلاثة ايام الى اليوم السابع، استخدم ورق الترشيح watman No1 في ترشيح المزرعة الفطرية السائلة للحصول على الراشح والذي نعتقد باحتواءه على منتجات الايض الثانوي للفطرين *T. harzianum* و *A. wenti*واستخدامه في اختبار امكانية تحفيز المقاومة في النباتات في التجارب اللاحقة وقد سُميَ الوسط الفطري بالراشح الفطري(٩).

طريقة تحضير لقاح فايروس موزائيك الطماطة:-

سحق ١غم 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% مبرد ذو رقم هيدروجيني ٧ ومبرد، ثم رشحت العصارة الناتجة خلال ٤ طبقات من الشاش الطبي وعرض الراشح للانتباذ بجهاز الطرد المركزي centerfuge (٥٠٠٠ دورة/الدقيقة) (١٠) اهمل بعدها الراسب وجمع الرائق في قناني زجاجية (٢ مل/حاوية) حفظت الحاويات في المجمدة لتكون مصدر للقاح الفايروسي المستعمل في التجارب اللاحقة.

عملية التلقيح الميكانيكي:

بعد تحضير اللقاح الفايروسي من النبات المصاب الوارد ذكرها سابقاً، لقحت الاوراق النباتية بفايروس موزائيك الطماطة بمسحها بأصابع اليد المغموسة في اللقاح المحضر بضغط خفيف بعد رش الاوراق بمادة مخدشة(carborundum 400 mesh)، غسلت الاوراق بعد التلقيح بالماء المقطر لمدة لاتتجاوز ٢٠ ثانية (٢ و١٠).

حساب مساحات الاوراق الملقحة:

رسمت الورقة الملقحة والمراد معرفة مساحتها على ورقة بيانية مع الاخذ بنظر الاعتبار الاستفادة من المربعات الكاملة والمنقوصة التي تشغلها صورة الورقة الملقحة على الورقة البيانية حسب القانون التالي:-

مساحة الور قة = عدد المربعات الكاملة + عدد المربعات المنقوصة / ٢. (١١).

تحضير التربة وزراعة النباتات:-

زرعت بذور الداتورة والطماطا في باديء الامر باستخدام فلينة الانبات المعبأة بمادة البتموس المعقمة، وبعد الانبات وظهور 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 بعد تعقيمها بجهاز الموصدة Autoclave على درجة حرارة ١٢١ م° وتحت ضغط ١.٥ بار ولمدة ٤٥ دقيقة على الاقل وتركها 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(١٢) وقد استخدم المبيد الحشري الفاسايبرمثرين ١٠% لمكافحة الحشرات كل اسبوع على الاقل.

طرائق استعمال الرواشح الفطرية:-

اختيار المرحلة العمرية للراشح الفطري الفعال بخلطه مع اللقاح الفايروسي واختبار تاثيرها في الورقة الملقحة.

لغرض تحديد افضل مرحلة عمرية للراشح الفطري للفطرين *T. harzianum* و *A. wenti* في تثبيط تضاعف فايروس موزائيك الطماطة، استخدم وسط البطاطا السائل وقسم الوسط الى سبعة اجزاء في حاويات زجاجية نظيفة سعة ٢٥٠ مل بواقع ١٠٠ مل لكل حاوية ولكل من الفطرين المذكورين ثم عقم بجهاز الموصدة في درجة حرارة ١٢١ م° وضغط 1.5 بار لمدة ٣٠ دقيقة. ترك الوسط ليبرد قليلا ثم لقح بالفطرين (قرص 0.9 ملم من المزرعة الفطرية لكل ١٠٠ مل من الوسط الغذائي) ووضع في حاضنة هزازة (١٥٠ دورة / دقيقة) بدرجة حرارة ٢٨ م° لمدة ٧ ايام مع الاخذ بنظر الاعتبار سحب حاوية واحدة لكل يوم ولكل فطر، وتسمى الحاوية المسحوبة في اليوم الاول ولكلا الفطرين براشح اليوم الاول والحاوية المسحوبة من الحاضنة في اليوم الثاني ولكلا الفطرين براشح اليوم الثاني وهكذا وصولا لليوم السابع. اخذ راشح كل يوم من الايام السبعة ولكلا الفطرين ومزج مع الفايروس بنسبة ١ : ١ وترك لمدة ساعة ثم لقحت بها اوراق نباتات داتورة وتركت لمدة

٨ ايام اي لحين ظهور النخرات على النباتات وبعدها حسبت مساحات الاوراق وعدد النخرات ومساحة النخرة الواحدة لكل مكرر ولكل معاملة وبعدها قورنت النتائج لتحديد عمر الراشح الفطري لكلا الفطرين والذي عمل على تثبيط تضاعف الفايروس ويحفز المقاومة في النبات ضد الفايروس. اما معاملة المقارنة فتمثلت بمزج اللقاح الفايروسي مع الماء المقطر او مع وسط البطاطا السائل.

تاثير خلط اللقاح الفايروسي مع تراكيز متدرجة من الراشح الفطري (بعُمُر ستة ايام) في تضاعف فايروس موزائيك الطماطة في اوراق نبات الداتورة.:

اجري هذا الاختبار لدراسة تاثير مزج راشح فطري *T. harzianum* و *A. wenti* بعمر اليوم السادس (افضل وقت او عمر لتثبيط تضاعف الفايروس حسب التجربة السابقة) كلا على انفراد مع اللقاح الفايروسي في احداث الاصابة في نباتات الداتورة، اذ شملت عينة المعاملة في هذه التجربة مزج الراشح الفطري وبتراكيز متدرجة في الماء المقطر او حامض السالسيلك مع اللقاح الفايروسي بنسبة ١ : ١ اما عينة السيطرة فشملت مزج اللقاح الفايروسي مع الماء المقطر او وسط البطاطا وبالنسب المذكورة اعلاه ثم ترك المزيج لمدة ساعة واحدة بعدها لقحت اوراق نباتات داتورة وبواقع خمسة مكررات لكل تركيز او معاملة. قرات النتائج بعد مرور ٨ ايام من التلقيح متمثلة بعدد النخرات ومساحاتها ومساحة الورقة وقورنت بمعاملة السيطرة.

المعاملات:-

١- فايروس : ماء بنسبة١:١ وفايروس: وسط البطاطا بنسبة ١:١
٢- فايروس : سالسيلك بنسبة ١ : ١
٣- فايروس : راشح *Trichoderma* تركيز ١٠٠% بنسبة ١ : ١
٤- فايروس : راشح *Trichoderma* تركيز ٧٥% بنسبة ١ : ١
٥- فايروس : راشح *Trichoderma* تركيز ٥٠% بنسبة ١ : ١
٦- فايروس : راشح *Trichoderma* تركيز ٢٥% بنسبة ١ : ١
٧- فايروس : راشح *Aspergillus* تركيز ١٠٠% بنسبة ١ : ١
٨- فايروس : راشح *Aspergillus* تركيز ٧٥% بنسبة ١ : ١
٩- فايلروس : راشح *Aspergillus* تركيز ٥٠% بنسبة ١ : ١
١٠-فايروس : راشح *Aspergillus* تركيز ٢٥% بنسبة ١ : ١

تاثير رش نباتات طماطة (مصابة بالفايروس) بالرواشح الفطرية وبمدد زمنية مختلفة في تضاعف فايروس موزائيك الطماطة.:

اختيرت نباتات طماطة بعمر الورقة الثالثة ومتجانسة ولقحت بالفايروس وذلك بمسح الوريقة الطرفية لكل ورقة مركبة من كل نبات بلقاح فايروس موزائيك الطماطة وبعد يوم واحد من التلقيح تم اجراء عدد من الرشات بالرواشح الفطرية لكلا الفطرين *T. harzianum* و *A. wenti* او حامض السالسيلك، اذ قسمت النباتات الى اربعة مجاميع وبواقع ثمانية نباتات لكل مجموعة وكالاتي:

١- المجموعة الاولى من ثمانية نباتات ترش جميعها براشح *T. harzianum* ويسحب نبات بعد كل رشة بحيث تكون النباتات قد استلمت رشة او رشتين او ثلاثة الى ثمانية رشات
٢- المجموعة الثانية من ثمانية نباتات ترش جميعها براشح *A. wenti* ويسحب نبات بعد كل رشة بحيث تكون النباتات قد استلمت رشة او رشتين او ثلاثة الى ثمانية رشات
٣- المجموعة الثالثة ايضا ثمانية نباتات ترش جميعها بحامض السالسيلك ويسحب نبات بعد كل رشة وحتى الوصول الى ثمانية رشات
٤- المجموعة الرابعة مكونة من ثمانية نباتات ايضا ترش جميعها بالماء المقطر او وسط البطاطا السائل (السيطرة) ويسحب نبات بعد كل رشة وكما ذكر في الفقرات اعلاه.

وبعد مرور ١٠ ايام استخرجت هذه النباتات من التربة وغسلت جيدا بالماء الجاري وهرست بصورة كاملة وبصورة مفردة كلا حسب معاملته وعدد رشاته في هاون خزفي وبوجود داريء فوسفاتي بنسبة ١ غم نبات / ٥ مل داريء فوسفاتي واستخدم العصير الناتج في تلقيح انصاف اوراق نباتات داتورة بعمر الورقة الرابعة، حسبت مساحات الاوراق وعدد النخرات / سم^{٢} الناتجة بعد مرور ٨ – ١٠ ايام من التلقيح.

تاثير غمر سويقات اوراق طماطة في راشح فطري *T. harzianum* و*A. wenti* او في حامض السالسيلك في تضاعف فايروس موزائيك الطماطة.:

استخدم راشح فطري *T. harzianum* و *A. wenti* بتركيز ٥٠% وحضر حامض السالسيلك بتركيز 0.01 % في الماء المقطر لغرض معرفة تاثير غمر سويقات اوراق الطماطة في الرواشح الفطرية في تضاعف الفايروس. اختيرت نباتات طماطة بعمر الورقة الرابعة ولقحت الورقة الاولى لكل نبات بفايروس موزائيك الطماطة وتركت لمدة يوم واحد فقط ، قطفت بعدها وغمرت سويقاتها في الرواشح الفطرية للفطرين كلا على انفراد او في حامض السالسيلك وتركت لمدة ٦ ايام (ذبول الاوراق عند تركها مدة اطول من ذلك) تحت ظروف البيت البلاستيكي.

هرست الاوراق مع كمية من داريء فوسفاتي بنسبة ٥ مل لكل غرام واحد من الاوراق الملقحة لغرض تقدير تركيز الفايروس على انصاف اوراق نبات الداتورة وبواقع ٥ مكررات وبعد مرور ٨ ايام من تلقيح اوراق الداتورة تم حساب عدد النخرات الناتجة. اما معاملة السيطرة فقد تضمنت اوراق طماطة عوملت بالطريقة ذاتها باستعمال الماء المقطر او وسط البطاطا السائل عوضا عن الرواشح الفطرية وخضعت لمراحل التجربة نفسها.

وقد كانت المعاملات كالاتي:-

١- غمر ثلاثة اوراق ملقحة بالفايروس في راشح فطر *Trichoderma*

٢- غمر ثلاثة اوراق ملقحة بالفايروس في راشح فطر *Aspergillus*

٣- غمر ثلاثة اوراق ملقحة بالفايروس في الماء المقطر وثلاثة اوراق اخرى في وسط البطاطا (السيطرة)

٤- غمر ثلاثة اوراق ملقحة بالفايروس في حامض السالسيلك

النتائج:

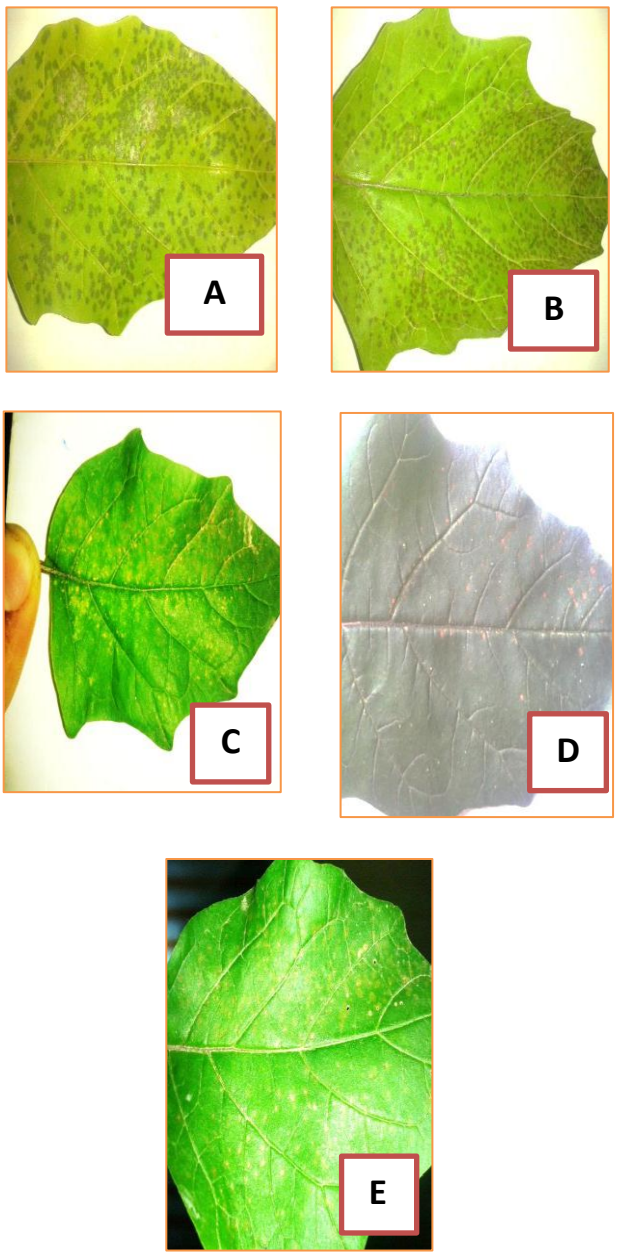
اظهرت نتائج التحليل الاحصائي المذكورة في الجدول ١ بان عدد النخرات لراشح فطر *T. harzianum* (شكل ١) اخذت بالانخفاض كلما زاد عمر الراشح من يوم الى اليوم السادس، اذ اعطى راشح اليوم السادس اقل عدد نخرات اذ بلغ 2.971 نخرة / سم^{2} مقارنة مع بقية المدد ومع معاملة السيطرة التي اعطت عدد نخرات بلغ 10.085 نخرة / سم^{2} للماء المقطر و 9.982 نخرة / سم^{2} لوسط البطاطا وبفارق معنوي وبالمقارنة مع معاملة حامض السالسيلك فقد كان راشح اليوم السادس للفطر *T. harzianum* الاكفأ في تثبيط تضاعف الفايروس على الرغم من عدم وجود فرق معنوي واضح، واختزلت اعداد النخرات في معاملة راشح فطر *A. wenti* مع زيادة عمر الراشح ابتداءاً من اليوم الاول الى اليوم السادس اذ اعطى اقل قيمة لعدد النخرات (4.580 نخرة / سم^{2}) وبفارق معنوي مع معاملة السيطرة المتمثلة بالماء المقطر ووسط البطاطا، وتبين بان راشح فطر *A. wenti* بعمر ستة ايام كان افضل من معاملة حامض السالسيلك في اختزال اعداد النخرات الا ان الفروق لم تكن معنوية. تشير النتائج ان امتلاك راشح كل من الفطرين *T. harzianum* و *A. wenti* فاعلية تثبيطية لفايروس موزائيك الطماطة بدلالة انخفاض عدد النخرات الموضعية الناتجة بصورة معنوية مقارنة بما اظهرته معاملتي السيطرة (ماء مقطر او وسط البطاطا) اذ بلغت في حالة الفطر *T. harzianum* 6.03 نخرة / سم^{2} وللفطر *A. wenti* 6.88 نخرة / سم^{2} في حين كانت لمعاملتي الماء المقطر ووسط البطاطا 10.13 و 9.93 نخرة / سم^{2} على الترتيب.

ومن ملاحظة المعدل العام لعمر الراشح الفطري تبين بان الراشح بعمر ستة ايام قد ثبط تضاعف فايروس موزائيك الطماطة بدلالة اختزاله لاعداد النخرات الظاهرة على نباتات الداتورة ولذلك استخدم راشح اليوم السادس في التجارب اللاحقة من هذا البحث.

جدول رقم ١ : اعداد النخرات الموضعية الناتجة من التلقيح بفايروس موزائيك الطماطة في اوراق الداتورة المخلوط مع راشحي الفطرين *T. harzianum* و *A. wenti* كل على انفراد وبعمر من يوم الى سبعة ايام.

المعاملة	عمر الراشح الفطري						
	عدد النخرات / سم٢						
	يوم	يومان	ثلاثة ايام	اربعة ايام	خمسة ايام	ستة ايام	سبعة ايام	المعدل
Trichoderma	8.564 ab	7.757 ab	6.825 ab	5.621 ab	4.776 b	2.971 b	5.677 ab	6.03 B
Aspergillus	9.158 ab	8.482 ab	7.336 ab	6.549 ab	5.613 ab	4.580 b	6.422 ab	6.88 B
Salicylic acid	5.369 b	5.294 b	5.245 b	5.259 b	5.231 b	5.674 ab	5.312 b	6.77 B
ماء مقطر	10.067 ab	10.149 a	10.208 a	10.152 a	10.188 a	10.085 ab	10.048 ab	10.13 A
وسط البطاطا	9.955 ab	9.958 ab	10.025 ab	9.901 ab	9.786 ab	9.982 ab	9.920 ab	9.93 A
المعدل	8.62 A	10.33 A	7.93 A	7.58 A	7.12 A	6.66 A	7.48 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 او افقيا لاتختلف عن بعضها معنويا وحسب اختبار اقل فرق معنوي المعدل(L.S.D.) وعلى مستوى معنوية 0.05 .**



شكل رقم ١ : اوراق نباتات داتورة تظهر عليها النخرات الموضعية كالاتي :

A – معاملة السيطرة (ماء مقطر). B – معاملة السيطرة (وسط البطاطا). C – ورقة داتورة معاملة براشح اليوم السادس لفطر *Trichoderma* . D – ورقة داتورة معاملة براشح اليوم السادس لفطر *Aspergillus* . E – ورقة داتورة معاملة بحامض السالسيلك.

تشير القراءات المدرجة في الجدول رقم ٢ بان خلط تراكيز متدرجة من الراشح الفطري (بعمر ستة ايام) مع اللقاح الفايروسي قد اعطى نتائج متفاوتة مقارنة مع معاملة السيطرة، اذ كان التركيز ٥٠% من راشح الفطرين الاكفأ في اختزال اعداد النخرات وتثبيط تضاعف فايروس موزائيك الطماطة مقارنة مع بقية التراكيز ومع معاملة السيطرة، اذ اعطى التركيز ٥٠% من راشح فطر *T. harzianum* عدد نخرات بلغ 3.795 نخرة / سم^2 مقارنة مع بقية التراكيز ومعاملة السيطرة المتمثلة بالماء المقطر ووسط البطاطا اللتان اعطتا عدد نخرات بلغ 10.078 و 9.912 نخرة / سم^2 ، اما فيما يخص راشح فطر *A. wenti* فقد اعطى التركيز ٥٠% ايضا اقل عدد نخرات مقارنة مع بقية التراكيز ومعاملة السيطرة، اذ اعطى عدد نخرات بلغ 4.014 نخرة / سم^2 .

يلاحظ من الجدول نفسه بان راشح فطر *T. harzianum* قد تفوق على راشح فطر *A. wenti* في قدرته على اختزال اعداد النخرات الا انها لم تصل الى مستوى الفروق المعنوية.

اما مايخص مساحة النخرات فيتبين من الجدول ذاته بان التركيز ٥٠% من راشح كلا الفطرين قد اعطى اقل مساحة للنخرات، اذ اعطى راشح فطر *T. harzianum* و *A. wenti* مساحة نخرات بلغ 0.435 و 0.410 ملم على التوالي وبفارق معنوي عن معاملة السيطرة، مما يدل على قدرة راشح الفطرين في هذا التركيز على تثبيط تضاعف الفايروس مما قلل من اعداد النخرات الظاهرة على النبات وبذلك فقد استعمل التركيز ٥٠ % في التجارب اللاحقة من هذا البحث.

جدول رقم ٢ : اعداد ومساحات النخرات الظاهرة على نباتات الداتورة والناتجة من خلط تراكيز متدرجة من الرواشح الفطرية مع اللقاح الفايروسي.

تركيز الراشح	عدد النخرات		مساحة النخرات	
	T. harzianum	*A. wenti*	*T. harzianum*	*A. wenti*
٢٥	7.098	7.860	0.578	0.547
٥٠	3.795	4.014	0.435	0.410
٧٥	8.597	6.707	0.533	0.525
١٠٠	9.080	9.116	0.568	0.533
Salicyl ic acid	5.266	6.345	0.607	0.475
ماء مقطر	10.078	9.622	0.707	0.679
وسط البطاطا	9.912	9.528	0.688	0.718
المعدل	7.69	7.60	0.588	0.559

عدد النخرات:الارقام تمثل متوسطات خمسة مكررات. (L.S.D. للنخرات = 1.027 ، L.S.D للمساحة = 0.0512).

مساحة النخرات: الارقام تمثل متوسطات مساحات عشرة نخرات لكل مكرر.

وقد اثرت زيادة عدد الرشات بصورة طردية في فاعلية راشح الفطر *T. harzianum* لتصل ذروة التأثير عند موعد الرشة الثامنة بدلالة الانخفاض الحاصل في عدد النخرات الموضعية الناتجة على نباتات الداتورة (جدول٣) وذلك عند مقارنتها مع معاملتي السيطرة (ماء مقطر ووسط البطاطا)، في حين كانت ذروة التاثير لراشح الفطر *A. wenti* عند الرشة الخامسة والثامنة والتي اعطت عدد نخرات بلغ

6.474 و 6.356 نخرة/سم^2 على التوالي وبفارق معنوي عن معاملة السيطرة. ومن ملاحظة المعدل العام لعدد النخرات الناتجة على نباتات الداتورة يتضح بان راشح فطر *T. harzianum* و*A. wenti* كانا الاكفا في اختزال اعداد النخرات مقارنة مع معاملة حامض السالسيلك، اذ اعطت معاملة راشح فطر *T. harzianum* معدلا لعدد النخرات بلغ 7.818 نخرة/سم^2 ومعاملة *A. wenti* 7.636 نخرة/سم^2 مقارنة بمعاملة حامض السالسيلك التي اعطت معدلا لعدد النخرات بلغ 8.352 نخرة/سم^2.

يتضح من خلال المعدلات العامة للمعاملة بالرواشح بان لراشح فطر *A. wenti* الثاثير المثبط الاعلى في فعالية فايروس موزائيك الطماطة اذ اعطى اقل عدد للنخرات الموضعية بلغ 7.636 نخرة/سم^2 يليه راشح فطر *T. harzianum* بمعدل عدد نخرات بلغ 7.818 نخرة/سم^2 ثم حامض السالسيلك الذي اعطى معدلا لعدد النخرات بلغ 8.352 نخرة/سم^2 وجميعها اعطت فروقا معنوية عند مقارنتها مع معاملة السيطرة (ماء مقطر، وسط البطاطا).

اما المعدل العام لعدد النخرات الموضعية الناتجة تحت تاثير عدد الرشات فيشير الجدول نفسه الى زيادة تدريجية لفاعلية الرواشح لتصل اعلى قيمة لها عند استلام النباتات ٦ رشات و ٨ رشات.

جدول رقم ٣: تاثير معاملة نباتات الطماطة بالرواشح الفطرية بمدد زمنية مختلفة في تضاعف فايروس موزائيك الطماطة في النباتات.

الراشح	عدد النخرات الموضعية / سم^2 عدد الرشات ١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	المعدل
Trichoderma	9.460 cd	8.590 de	8.413 de	8.351 de	7.853 e	6.988 f	6.773 fg	6.120 g	7.818 D
Aspergillus	9.224 cd	8.891 d	8.456 de	7.624 ef	6.474 fg	7.255 ef	6.810 fg	6.356 fg	7.636 D
Salicylic acid	10.627 b	9.739 c	9.607 cd	8.813 d	7.768 ef	7.129 ef	6.834 fg	6.302 fg	8.352 C
ماء مقطر	10.843 b	11.833 ab	11.626 ab	10.858 b	11.710 ab	11.132 b	12.164 a	11.085 b	11.406 A
وسط البطاطا	10.748 b	11.919 ab	10.779 b	11.647 ab	9.950 A	9.285 B	9.084 BC	8.675 C	8.873 C	11.165 b	11.316 A
المعدل	10.180 A	10.194 A	9.285 B	9.950 A	9.084 BC	8.675 C	8.873 C	8.206 D	

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 .

وتوضح النتائج المعروضة في الجدول رقم ٤ بان غمر سويقات اوراق الطماطة في راشح فطر *T. harzianum* بعد تلقيحها بالفايروس لمدة يوم واحد قد ادى الى تثبيط تضاعف الفايروس في الورقة الملقحة والذي ادى الى اختزال اعداد النخرات الظاهرة على اوراق الداتورة اذ اعطت هذه المعاملة عدد نخرات بلغ 3.778 نخرة/سم^2(نسبة التثبيط 60.89%) مقارنة مع عدد النخرات الناتجة من معاملة السيطرة والتي اعطت معدلا بلغ 9.868 نخرة/سم^2 للماء المقطر و 9.662 نخرة / سم^2 لوسط البطاطا وبفرق معنوي كبير جدا وكذلك الحال لراشح فطر *A. wenti* اذ عمل على اختزال اعداد النخرات بصورة معنوية وبنسبة تثبيط بلغت 48.40 % مقارنة مع معاملة السيطرة، اذ توضح بان راشح فطر *T. harzianum* افضل من راشح فطر *A. wenti* في اختزال عدد النخرات على النباتات. ونلاحظ من خلال النتائج ايضا تفوق معاملة راشح فطر *T. harzianum* في اختزال اعداد النخرات مقارنة بمعاملة حامض السالسيلك التي اعطت عدد نخرات بلغ 4.252 نخرة/سم^2 الا انها لم ترتقي الى مستوى الفروق المعنوية.

ويبين الجدول نفسه بان مساحة النخرات قد اختزلت عند معاملة النباتات براشح فطر *T. harzianum* والتي اعطت مساحة نخرات بلغ 0.415 ملم مقارنة مع معاملة الماء المقطر ووسط البطاطا (السيطرة) التي اعطت مساحة نخرات بلغ 0.586 ملم و 0.573 ملم وبفرق معنوي بينهما وكذلك الحال بالنسبة لراشح فطر *A. wenti* الذي اختزل مساحة النخرات بفارق معنوي مع معاملة السيطرة.

جدول رقم ٤ : تضاعف فايروس موزائيك الطماطة بدلالة اعداد ومساحات النخرات على نباتات الداتورة نتيجة غمر سويقات اوراق طماطة (مصابة) في راشح فطري *T.. harzianum* و *A. wenti* .

الفطر	عدد النخرات / سم^2	مساحة النخرة ملم^2
Trichoderma	3.778 C	0.415 B
Aspergillus	4.985 B	0.486 B
Salicylic acid	4.252 C	0.480 B
ماء مقطر	9.868 A	0.586 A
وسط البطاطا	9.662 A	0.573 A

عدد النخرات: الارقام تمثل متوسطات خمسة مكررات.

مساحة النخرات: الارقام تمثل متوسطات مساحات عشرة نخرات لكل مكرر.

ان فطر *T. harzianum* يستطيع تحفيز المقاومة الجهازية ضد الممرضات وموجود في المنطقة المحيطة بالجذور النباتية (١٣) ومستعمراته موجودة في كل مكان وعلى المواد السليلوزية وكذلك على الاجزاء النباتية الميتة (١٤) وتمتلك اليات دفاعية تتمثل بالسلاح الكيميائي والانزيمي مما يجعل *T. harzianum* مهمة كعامل سيطرة حيوي سواءا الفطر نفسه او منتجات الايض الثانوي المفرزة من هذه الفطريات (١٥)، اذ وجد بان مادة Trichokonins المعزولة من فطر *T. harzianum* تستطيع تحفيز المقاومة الجهازية واليات الدفاع في نباتات التبغ ضد فايروس موزائيك الطماطة، اذ استطاعت هذه المادة من تثبيط عدد النخرات الى ٥٤% (١٦)،

ان التاثير التثبيطي للمادة المثبطة يكون اما بتثبيط قدرة الفايروس المنقولة ميكانيكيا على اصابة النبات العائل وذلك عند مزج المادة المثبطة مع عصير النبات المصاب اي المعاملة خارج النسيج الحي in vitro او بمعاملة النبات السليم بالمادة المثبطة قبل الاصابة بالفايروس او بعد الاصابة وذلك بمعاملة (بالرش) اوراق النبات بمحلول المادة المثبطة اي تحفيز المقاومة في النبات (١٧).

فضلا عن ماذكر سابقا فان فطر *A. wenti* ينتج العديد من المواد المثبطة كالانزيمات خارج الخلية والاحماض العضوية والعديد من منتجات الايض الثانوي المهمة في التقانة الحيوية (18) اذ ان مادة Malformin A_1 المنتجة من فطر *A. wenti* له فعالية تثبيطية ضد الاصابة وتضاعف فايروس موزائيك الطماطة بالاضافة الى كونه منظم نمو نباتي (١٩) وخصائص Malformin A_1 كمادة مضادة للفايروسات يعود الى قدرتها على تنظيم وانتاج الاثيلين ethylene الذي يحفز الالية الدفاعية في النبات العائل، وجميع ماذكر يتفق مع نتائج الجداول ١ و ٢ و ٣ و٤ و٥ و٦ الذي تبين من خلالها قدرة راشح الفطرين على تثبيط تضاعف فايروس موزائيك الطماطة.

المصادر:

1- Agrios, G. 2005. Plant pathology. Slsevier Acadmic press. 983 pp.

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

3 - Cook, RJ. 2000. Advance in plant health management in the 20th century. Annu. Rev. phytopathol. 38: 95 – 116.

4- Perello, A.; C. Monaco; M.R. Simon; M. Sisterna; G. Dalbello. 2003. Biocontrole efficacy of Trichoderma isolates for tar spot of wheat in Argentina. Crop prot. 22 (7): 1099 – 1106.

5- Sivasithamparam, K. and E.L. Ghisalberti. 1998. Trichoderma and Gliocladium. Vol 1 (eds kubicek, c.p. and Harman, G.E.) 139- 191 (Taylor and Francis). London.

6 - Ouyang, MA; Wu ZJ; Tan Qw. 2009. New asperxanthone and asperbiphenyl from the marine fungus Aspergillus sp . pest management science. Fujian Agriculture and forestry university. 65 (1) : 5 – 60. Pub med.

7- Valero., A.; Olivan, A.; Marin, S.; Sanchis, V.; Ramos, A. J. 2007. Effect of intra and inter specific intraction on OTA production by A. Section niger : ingrapes during dehydration. Food microbial. 24, 254 – 259.

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

9- Chambers, S.M. and E. S. Scott. 1995. In vitro antagonism of phytophthora cinnamomi and P.

15- Vinale, F.; Ghisalberti, El.; Sivasithamparam, K.; Marroy, R.; Ritieni, A.; Ferracane, R.; Woo, S,; Lorito, M. 2009. Factors affecting the production of Trichoderma harzianum secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. Lett Appl microbial 48: 705 – 711.

16- 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.

17- Kado, C. I. and H. O. Agrawal. 1972. Principles and techniqnes in plant virology New York, Van Nostrand Reiuhold co.

18- Masayuki, M. and Katsuya, G. 2010. Aspergillus molecular biology and Genomics. Pp 238. ISBN: 978 -1- 904455-53 – 0.

19- Qing – Wei Tan; Fang – Luan Gao; Fu – Rong Wang and Qi – Jian Chen. 2015. Anti – TMV activity of malformin A1, acyclic penta – peptide produced by an Endophytic Fungus Aspergillus tubingensis tubingensis FJBJ 11. Int. J. Mol. Sci. 16, 5750 – 5761; doi: 10.3390.

citricola by isolates of Trichoderma sp.and Gliocladium virens. J. phytopathol 143: 471 – 477.

١٠- السعيدي، ساجد صلاح الدين سليم. ٢٠٠٤. تحفيز المقاومة في نبات الطماطة Esculentum Lycopersicon ضد الاصابة بفايروس موزائيك الطماطة Tomato mosaic virus عن طريق مستخلصات نباتية. اطروحة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

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

١٢- 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.

13- Harman, GE. 2000. Myths and dogmas of biocontrol in perceptions derived from research on Trichoderma harzianum T22. Plant Dis 84: 377 – 393.

14- Jaklitsch, WM. 2009. European species of Hypocrea. Part 1. The green – spored species. Stud mycol 63: 1- 91.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2015 ,(9), (3) :01-10

Using secondary metabolites products of *T. harzianum and A. wenti* in resistance induced in tomato plants *Lycopersicon esculentum* aganist Tomato Mosaic Virus

Rajaa fadhil hamdi Sajid Salahuddin Saleem

E.mail:

Abstract::

The study was conducted to evaluate the inhibition activity of *Trichoderma harzianum* and *Aspergillus wenti* and Salicylic acid (0.01 %) solution against Tomato Mosaic Virus (ToMV). The possibility of the use of fungal filtrates in stimulate resistance in tomato plants against virus infection have been studied for this purpose *Datura stramonium* leaves have been inoculated with mixture composed fungal filtrates and Tomato Mosaic Virus (ToMV) .The results showed that the the number of lesion for the *T. harzianum* filtrate decrease with increasing the age of filtrate from one day to six day, The six filtrate gave lowest of lesion number, 2.971 lession/ cm^2 compared with anathor period and control treatments which gave 10.085 lession / cm^2 for water and 9.982 lession/ cm^2 for potato media with significant differences compared with salicylic acid . The sex day filtrates for *T. harzianum* gave the grate effect on inhibition of virus replication, and also for *A.wenti filtrate* treatment which reduce the number of lesion with increasing the age of fungi filtrate beginning from first day to sex day and gave 4.580 lession/ cm^2 with the significant differences compared with the controle treatment (water and potato media).The concentration 50% from both fungi (*T. harzianum* and *A. wenti)*gave the grate effect in inhibition of lesion number and inhibitor of Tomato mosaic virus replication comparing with the other concentrations and control treatment. The crud filtrate for *T.harzianum* with concentration 50% gave the highiest inhibition rate 61.712% (local lesion 3.795 lession/ cm^2) then *A. wenti* filtrate with inhibition rate 57.871 % (No of local lesion 4.014 lession / cm^2).The resalts also showed that the resistance induced by spreading tomato plants with the filtrate of *T. harzianum* , *A. wenti* and salicylic acid, the *T. harzianum* have the highiest effect in virus inhibition with increasing the number of spreading untile 8 with the inhibition rate 45 % while *A. wenti* fungi gave inhibition rate 43.072%. Soacking steams of Tomato leaves with *T. harzianum* filtrate after inoculated with virus for one day led to inhibition the virus replication in leaves , with inhibition rate 65.782% (No. of local lesion 2.373 lession/ cm^2) while gave 52.357 for *A. wenti* fungi filtrate (local lesion No. 3.304 lession/ cm^2).