التأثير التضادي لثلاث عزلات محلية وعزلتين تجاريتين من فطر *Trichoderma* ضد فطر *Sclerotinia sclerotiorum*

عواطف علي شليبك[1]، *هيفاء محمد دوزان[2]، نورية علي العامري[2]، انتصار علي القماطي[3] وعبد النبي محمد أبوغنية[4]

1- مركز بحوث التقنيات الحيوية 2- قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة طرابلس
3- قسم الإحصاء – كلية العلوم – جامعة طرابلس 4- قسم النبات – كلية العلوم – جامعة طرابلس

المستخلص

أجريت هذه الدراسة المعملية لاختبار التأثير التضادي لثلاث عزلات محلية من فطر *Trichoderma* spp. *T. longibrachiatum* UAMH7955 (Lib1)، *T. harzianum* (Lib2)، *T. longibrachiatum* UAMH7956 (Lib3) وعزلتين تجاريتين (T22) *T. harzianum* ATCC20847، (Tp1) *T. atroviride* ATCC74058 ضد فطر *Sclerotinia sclerotiorum* عند درجتي حرارة 20 و 25^{0}م. أوضحت النتائج كفاءة عزلات *Trichoderma* في تثبيط نمو وتكوين الأجسام الحجرية لفطر *S. sclerotiorum* عند درجتي حرارة 20 و25^{0}م. بلغت نسبة تثبيط نمو ميسليوم *S. sclerotiorum* 55% و 45% في معاملة العزلة، Lib3 والعزلة Lib1على التوالي عند درجة حرارة 25^{0}م، بينما كانت القدرة التضادية ما بين عزلات *Trichoderma* متقاربة 30 – 34 % عند درجة 20^{0}م، ومن ناحية أخرى تفوقت جميع العزلات (Lib1، Lib2، Lib3، T22) في تثبيط تكوين الأجسام الحجرية عن العزلة Tp1عند درجة حرارة 25^{0}م، وكان أقل معدل تثبيط تكوين الأجسام الحجرية 61 و 49.7 % في معاملتي (Lib2, Tp1) عند درجة حرارة 20^{0}م. أظهرت العزلتان Lib2، T22 تأثيراً معنوياً في تثبيط تكوين الأجسام الحجرية 74، 77.7، 91، 91 % على التوالي عند درجتي حرارة 20 و 25^{0}م. اختبر تأثير عزلات الفطر المضاد على إنبات بذور البازلاء (صنف محلي) بعد معاملتها مسبقاً بعزلات *Trichoderma* لمدة 12 و 24 ساعة حيث أظهرت النتائج معدل الإنبات بنسبة 96.9% للبذور المعاملة بالعزلتين Lib1،Lib2وبنسبة 76% عند المعاملة بالعزلةTp1، كما سجل انخفاض في معدل إصابة البادرات بفطر *S. sclerotiorum* عند معاملتها بعزلات *Trichoderma*.

الكلمات الدالة: مكافحة حيوية، التضاد الفطري، *Sclerotinia*، *Trichoderma*.

المقدمة

تعد أمراض العفن السكليروتيني المتسببة عن فطر *S. sclerotiorum* من أهم الأمراض التي تصيب محاصيل الخضر تحت ظروف الزراعة المحمية أو في الحقل، وتسبب خسائر اقتصادية لأكثر من 480 نوعاً من

*للاتصال: هيفاء محمد دوزان . قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة طرابلس / ليبيا.
هاتف: 218913229830+ البريد الالكتروني: h.duzan@uot.edu.ly

استلمت بتاريخ: 2020/12/16 أجيزت بتاريخ: 2021/4/12

العوائل النباتية (Clarkson *et al.,* 2004). و قد أدت هذه الخسائر التي تسببها الفطريات الممرضة وغيرها من آفات التربة خلال مراحل نمو النبات المختلفة إلى تنوع أساليب مكافحتها، ومهما تنوعت هذه الأساليب فهي إما أن تؤدي إلى إبادة عامة للأحياء الدقيقة بالتربة كما يحدث عند التعقيم بغاز بروميد الميثيل، أو أنها تؤثر على مجموعة دون أخرى كما يحدث عند استخدام مبيدات متخصصة لمكافحة الفطريات (اسطفيان وآخرون، 2002). وقد بينت دراسات عديدة أن لمعظم المبيدات تأثيرات ضارة على صحة الإنسان والبيئة، واعتبرت من أهم عوامل التلوث، مما تطلب البحث عن بدائل آمنة في مكافحة الآفات الزراعية، من ضمنها المكافحة الحيوية التي تعتمد على محاكاة ما يحدث في الطبيعة من تداخلات متضادة بين الكائنات المتنوعة، وذلك باستخدام عوامل مكافحة حيوية لمكافحة مسببات أمراض النبات (أبو عرقوب، 2000 و Mahmood *et al.*, 2016).

يعتبر فطر *Trichoderma* من أهم عوامل المكافحة الحيوية الذي عُرف تأثيره التضادي على الفطريات الممرضة للنبات منذ أكثر من 70 سنة (Weindling, 1934). لقد أشارت العديد من الدراسات إلى قدرة بعض سلالات فطر *Trichoderma* على التضاد المباشر وغير المباشر بآليات متنوعة ضد الكائنات الممرضة للنبات من خلال تداخله الثلاثي مع النبات والكائن الممرض، وذلك عبر إنتاج مضادات حيوية، إنتاج إنزيمات محللة للجدر الخلوية، التنافس على المغذيات، التطفل و تحفيز مقاومة النبات ضد الممرضات (Woo *et al.,* 2006; Verma *et al.,* 2007; Abadi *et al.*, 2017). لا يعتمد نجاح هذه الآليات المختلفة في المكافحة الحيوية على سلالة *Trichoderma* والكائن الممرض والنبات العائل فقط بل على الظروف البيئية التي تشمل: درجات الحرارة، وفرة المغذيات، الأس الهيدروجيني وتركيز الحديد أيضاً. إن استخدام عزلات محلية من فطر *Trichoderma* متأقلمة مع الظروف البيئة التي يتواجد بها النبات والكائن الممرض يعزز من فرص نجاح المكافحة الحيوية (Howell, 2003). بين Asad *et al.,* (2014) قدرة عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط أو قتل العديد من الفطريات عن طريق التطفل المباشر في الوسط الذي تعيش به. ورجح (الشعبي ومطرود، 2002) أن قدرة بعض عزلات *Trichoderma* على التضاد مع بعض الفطريات ترجع إلى إفرازها للعديد من المواد الأيضية السامة والمضادات الحيوية والإنزيمات ضد بعض الفطريات الممرضه للنبات مثل *Pythium*، *Rhizoctonia* و*Sclerotinia*.

يعمل فطر *Trichoderma* على تعزيز نمو النبات إلى جانب التأثير المثبط لنمو الفطريات الممرضة للنبات وذلك برفع كفاءة التمثيل الضوئي وتحسين خصائص التربة حول المجموع الجذري (Rhizosphere) وامتصاص المغذيات المعدنية والمضافة له من الأسمدة (Howell, 2003). وقد سجل Vinali *et al.*, (2004) زيادة في إنتاج الطماطم والخس والفلفل عند معاملة البذور بالجراثيم الكونيدية لفطر *T. harzianum* T22 و *T. atroviride* P1 تحت ظروف الزراعة المحمية والحقلية. وفسر Brenner (1981) أن التأثير الإيجابي لفطر *Trichoderma* على نمو النباتات يرجع إلى قدرته على إنتاج منتجات الأيض الثانوية التي تعمل بطريقة مشابهة لآلية عمل الأوكسينات. تم استخلاص وتعريف Koninginin و 6-pentyl-apyrone من *T. harzianum* واعتبرت منتجات أيض ثانوية نشطة حيويا تعمل كمنظمات نمو للنبات (Cutler *et al.* 1986 a, Cutler *et al.,* 1989 b) ، وقد أظهرت نتائج العديد من الدراسات كفاءة أنواع *Trichoderma* في مكافحة أمراض المجموع الخضري (Tronsmo, 1986) والمجموع الجذري (Chet, 1987)، ولكن فاعلية النشاط التضادي تكون أعلى كفاءة في مكافحة المرض عند نشوء وتواجد عوامل المكافحة الحيوية وممرضات النبات في نفس البيئة. أشارت العديد من الدراسات إلى كفاءة العزلات المحلية للفطر *Trichoderma* spp. والتي

عزلت من ترب مناطق مختلفة من ليبيا في تثبيط العديد من الفطريات الممرضة القاطنة بالتربة التي تصيب عوائل مهمة إقتصاديا مثل :.*Fusarium* spp، *R. solani*، *S. sclerotiorum*، *Botrytis cinerea* (Duzan *et al.*, 2007)، (الغرياني وآخرون، 2008، العربي وآخرون، 2013)، (Abadi *et al.*, 2017) ، (الغويل، 2019).

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم قدرة تضاد خمس عزلات من فطر *Trichoderma* ثلاثة منها محلية عزلت في دراسة أخرى من التربة الليبية (Duzan *et al.*, 2007, b) وهي *T. longibrachiatum* UAMH76955 (Lib1)، *T. harzianum* (Lib2) *T. longibrachiatum* UMAH7956 (Lib3) واثنتان تجاريتان شائعتا الاستخدام كعوامل مكافحة حيوية (Harman, 2000; Tronsmo, 1986) *T. harzianum* ATCC20847 (T22)، *T. atroviride* ATCC74058 (TP1) ضد الفطر المسبب لمرض العفن السكليروتيني *S. Sclerotiorum* عند درجتي الحرارة (20 و 25^{0}م) ودراسة تأثير الفطر الممرض على انبات بذور البازلاء المعاملة مسبقا بعزلات *Trichoderma* لمدة 12 و24 ساعة.

المواد وطرائق البحث

مصدر الفطريات: تم الحصول على مزرعة فطر *S.sclerotiorum* من أ.د. صالح الهادي الشريف عزلت من نبات بازلاء مصاب بالعفن السكليروتيني في مختبر أمراض النبات بقسم الوقاية – كلية الزراعة / جامعة طرابلس. وتم الحصول على العزلات المحلية لفطر *T. longibrachiatum* UAMH7955 (Lib1) ، (Lib2) *T. harzianum*، *T. longibrachiatum* UAMH7956 من مختبر الفطريات بمركز التقنيات الحيوية والتي عرفت في دراسة سابقة أجرتها (Duzan *et al.*, 2007 b) وأخرى تجارية *T. harzianum* ATCC20847 (T22) و ATCC74058 (TP1) *T. atroviride* من معمل المكافحة الحيوية بجامعة نابولي. نُميت جميع هذه الفطريات على الوسط الغذائي Potato Dextrose Agar (PDA) عند درجة حرارة 23 ± 2°م.

دراسة التضاد: دُرس تأثير التضاد المباشر لأنواع *Trichoderma* على نمو وتكوين الأجسام الحجرية لفطر *S. sclerotiorum* في المعمل. احتوت التجربة على 11 معاملة لكل درجة حرارة وثلاثة مكررات بتصميم كامل العشوائية. حيث جهزت مزارع نشطة من عزلات الترايكودرما Lib1، Lib2، Lib3، T22 وTp1 وذلك بوضع قرص قطره 7مم على الوسط الغذائي PDA. جهزت أطباق بتري 90 مم تحوي الوسط الغذائي PDA وحقنت بأقراص عزلات *Trichoderma* ووضعت على مسافة 5.5سم من قرص مماثل من نمو فطر سكليروتينيا (Inbar *et al.*, 1996).

حضنت الأطباق عند درجات حرارة (20 و 25^{0}م) وأخذت النتائج بقياس النمو اليومي لقطر المستعمرة لمدة 4 أيام من التحضين، وتم حساب نسبة التثبيط للنمو القطري بالمعادلة الآتية: L%= {(C-T)/ C}×100 حيث أن L:- نسبة التثبيط للنمو الخيطي للميسليوم، C:- نمو الفطر الممرض في الشاهد،T: - نمو فطر *S. sclerotiorum* في وجود عزلات الترايكودرما (Edington *et al.*, 1971). حسبت درجات التضاد للمزارع من 1- 4 اعتماداً على مقياس (Bell *et al.*, 1982) للأطباق المحقونة بعزلات فطر الترايكوديرما والسكليروتينيا حيث أن:

1= نمو فطر الترايكوديرما يشغل سطح الطبق بالكامل. 2= نمو فطر الترايكوديرما يشغل 75% من سطح الطبق. 3= نمو فطر الترايكوديرما يشغل 50% من سطح الطبق. 4= نمو فطر الترايكوديرما يشغل 25% من سطح الطبق. واستمر تسجيل عدد الأجسام الحجرية المتكونة من الفطر الممرض لكل المعاملات لمدة 4 أسابيع.

إثبات الإمراضية لفطر *S. sclerotiorum* على بذور البازلاء:

تم معاملة بذور البازلاء بالأجسام الحجرية وميسليوم من عزلة *S. sclerotiorum* من مزرعة بعمر سبعة أيام

نميت على آجار مائي بتركيز 1% عند درجة حرارة 22±2°م. تم تطهير بذور البازلاء سطحياً بمحلول هيبوكلورايت الصوديوم بتركيز 1% لمدة ثلاثة دقائق ثم غسلت بالماء المقطر المعقم. وضع عدد 10 بذور بازلاء وقرص 7 مم من مزرعة فطر السكليروتينيا بعمر 7 أيام في المعاملة الأولى، و10 بذور بازلاء وقرص 14 مم من مزرعة السكليروتينيا في المعاملة الثانية بنفس العمر، بينما احتوت المعاملة الثالثة على بذور بازلاء وأجسام حجرية لفطر السكليروتينيا. والمعاملة الرابعة ممثلة للشاهد، حيث تم وضع البذور فقط في الآجار المائي بواقع ثلاثة مكررات لكل المعاملات نقلت الأطباق إلى الحضان عند درجة حرارة 22 ±2°م (Zhang and Yang, 2000). سجلت النتائج بعد 7 أيام من التحضين، تم حساب معدل قياس العدائية للفطر الممرض لكل المعاملات (Talagiba *et al.,* 1998) بالمعادلة التالية: (الدليل المرضي) **د.م = مجموع (قراءة المرض X عدد النباتات المصابة)/(عدد النباتات الكلي X أعلى نسبة)** حيث تم قياس معدل العدائية لكل البذور كالآتي:

0 = إنبات البذور دون ظهور أعراض إصابة،

1 = إنبات البذور مع تغير طفيف في لون الجذير،

2 = تغير شديد في اللون مع قصر في طول الجذير،

3 = موت البذور قبل الإنبات،

4 = موت البذور بعد الإنبات،

دراسة تأثير الفطر الممرض *S. Sclerotiorum* على إنبات بذور البازلاء المعاملة مسبقاً بعزلات *Trichoderma*.

أجريت هذه التجربة لغرض دراسة قدرة عزلات الترايكوديرما على تحفيز مقاومة النبات لفطر سكليروتينيا في المراحل الأولى من إنبات بذور بازلاء معاملة مسبقاً (12، 24 ساعة) بعزلات الترايكوديرما. عقمت بذور البازلاء بمحلول هيبوكلورايت الصوديوم بتركيز 1% لمدة ثلاثة دقائق، ثم عوملت بالماء المقطر المعقم ونقلت الى أطباق بتري قطرها 15 سم احتوت على مزارع عزلات الترايكوديرما بعمر7 أيام. تركت البذور على البيئة المحتوية على عزلات الترايكودرما لفترتين 12، 24 ساعة، ثم نقلت البذور إلى أطباق بتري تحوي مزارع فطر السكليروتينيا بعمر 7 أيام بمعدل 10 بذور/طبق بواقع 3 مكررات لكل معاملة، وضعت الأطباق في الحضان عند حرارة 22 ± 2 **°**م (Zhang and Yang, 2000). أخذت النتائج بعد 10 أيام من التحضين. وحددت نسبة الإنبات كالآتي:

نسبة إنبات البذور= عدد (البادرات) النامية / العدد الكلي للبذور × 100

نسبة الإصابة= عدد البادرات المصابة/ العدد الكلي × 100

تم تحليل البيانات المتحصل عليها بواسطة تحليل التباين باستخدام البرنامج SPSS (Statistical Package of Social Science Version 11.0). استخدم اختبار Tukey HSD للمقارنة بين المتوسطات عند مستوى معنوية ($p<0.05$) في دراسة التضاد. كما استخدم اختبار استقلالية العوامل لتحليل بيانات ارتباط زمن المعاملة بمعدل إنبات وإصابة بذور البازلاء عند مستوى معنوية ($P<0.05$) (Sendecor and Cochran, 1980).

النتائج والمناقشة

تأثير التضاد المباشر لعزلات *Trichoderma* على نمو وتكوين الأجسام الحجرية لفطر*S. sclerotiorum* عند درجتي حرارة 20 و 25 **°**م:

بينت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروقاً معنوية بين المعاملات في معدل تثبيط النمو القطري لميسليوم فطر *S. sclerotiorum* بواسطة عزلات *Trichoderma* عند درجتي الحرارة 20 و 25°م. وقد تراوحت نسبة التثبيط بين 30.8- 34.8% عند درجة حرارة 20°م، ينما بلغ معدل تثبيط النمو القطري للفطر الممرض عند درجة 25°م إلى 55.7 % و 45 % للمعاملتين Lib3، Lib1 على التوالي، وكان أقل معدل تثبيط 33.9% للعزلة T22 (جدول 1). لوحظ حدوث تداخل ما بين فطري *Trichoderma* و *Sclerotinia* بعد

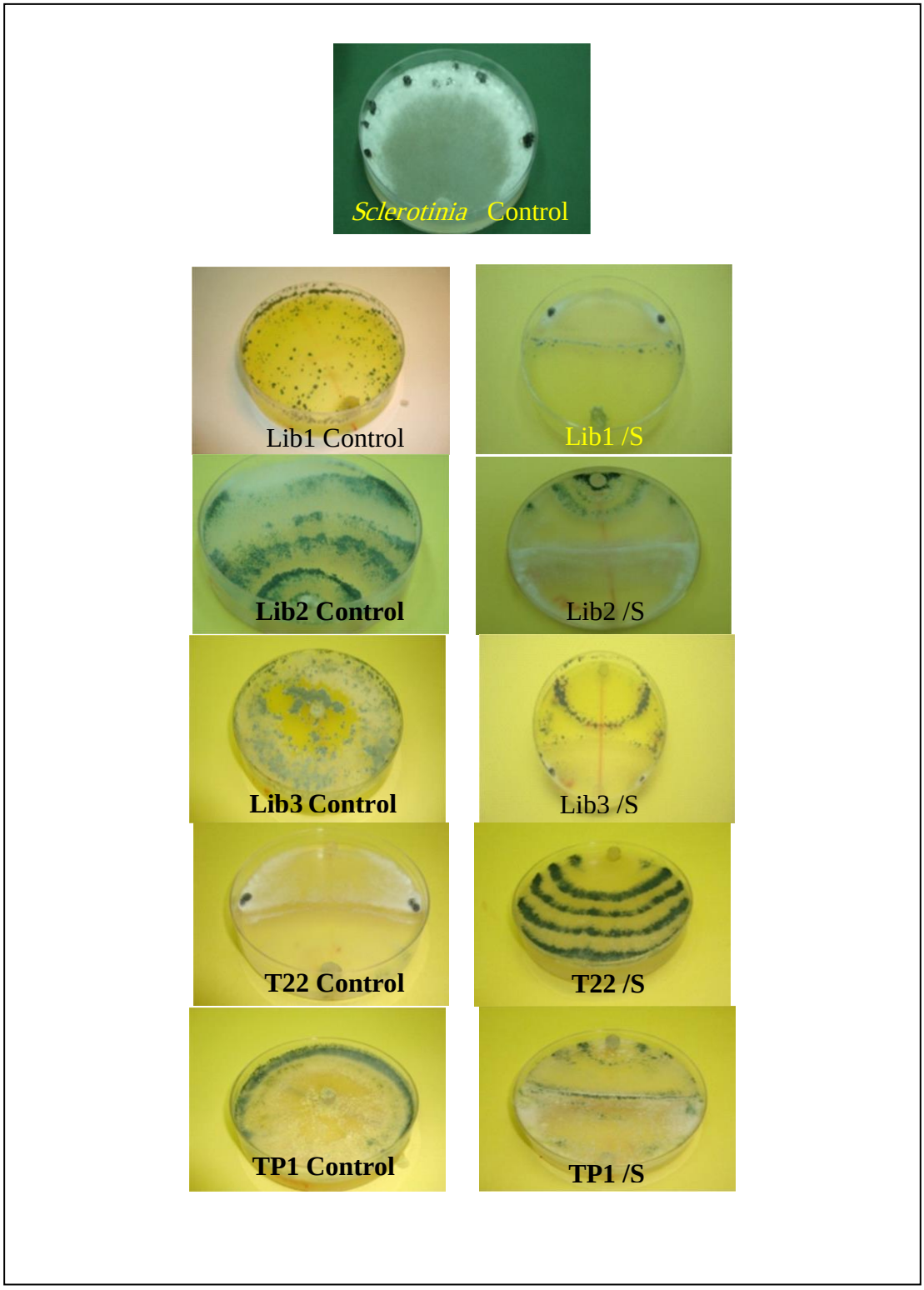
48 ساعة من الحقن، وبعد 3- 4 أيام حدث غزو كثيف وسريع من قبل عزلات *Trichoderma*T22، Lib2، حيث لوحظ نموها فوق مستعمرة *Sclerotinia* وتغطية الأجسام الحجرية المتكونة بالكامل. لم يسجل ظهور هالة أو منطقة تثبيط مابين *Trichoderma*و *Sclerotinia* لجميع المعاملات شكل (1، 2) ويرجح أن يكون هذا التشابه في النمو والتأثير ما بين العزلة المحلية Lib2 و T22 إلى أن العزلة المحلية والتجارية هما من نفس الجنس والنوع *T. harzianum*، ولكن لا يمكن الجزم بتطابق العزلتين على مستوى السلالة، حيث تم عزلهما من بيئتين مختلفتين. تتفق هذه النتائج مع نتائج أبو رغدة وسيدهومي (2003) التي بينت قدرة عزلات *Trichoderma* على تثبيط سرعة نمو الممرض. يوجد فرق معنوي في متوسط أعداد الأجسام الحجرية المتكونة ودرجة العدائية ضد الفطر *Sclerotinia* بين المعاملات عند درجة حرارة 25^{0}م (شكل 3، جدول 2)، حيث بلغت 91 % في معاملتي Lib2، T22 وبدرجة تضاد 1 لكلتا العزلتين، بينما كانت نسبة التثبيط أقل عند درجة حرارة 20^{0}م بمعدل 74% للعزلة Lib2 و 77.7% للعزلة T22 التي تقارب مع نسبة التثبيط 71% في معاملة العزلة Lib3 وبدرجة تضاد 2 لثلاث عزلات. وقد يعزى هذا التأثير المتفاوت بين معاملات عزلات *Trichoderma* على معدل تكوين الأجسام الحجرية *Sclerotinia* إلى تأثير درجة الحرارة - أيضاً - على نمو الفطر الممرض بالرغم من إشارة بعض المراجع (Abawi and Grogan, 1975) إلى أن درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر 20 - 25^{0}م وهو المدى الذي يقع ضمنه درجتي الحرارة الذي نفذت فيه هذه الدراسة، مع الأخذ بعين الاعتبار الموقع الجغرافي الذي ينمو فيه الفطر (Bolton *et al.,* 2006)، تكوين الأجسام الحجرية هي آلية يبقى عليها الفطر حياً خلال فترة البقائية عند غياب العائل أو ظروف بيئية محيطة لا تناسب نمو الفطر (Sarhan and Mehta, 2008) أظهرت النتائج الفعالية العالية - أيضاً - للعزلة Lib1 في تثبيط تكوين الأجسام الحجرية، والتي بلغت 85% ودرجة تضاد 2 وذلك عند درجة 25^{0}م. لوحظ أن درجة التضاد في أغلب المعاملات كانت 2 أو أقل فيما عدا المعاملة بالعزلة Tp1 إذ كانت درجة التضاد 4 عند درجتي حرارة 20 و 25^{0}م.

جدول 1. نسب تثبيط عزلات فطر *Trichoderma* لنمو فطر *Sclerotinia Sclerotiorum*

عند درجتي حرارة 20 و 25 °م

نسبة التثبيط عند 25°م	نسبة التثبيط عند 20°م	*Trichoderma* / *Sclerotinia*
%45	%30.8	Lib1-S
%40	%30.6	Lib2-S
%55.7	%34.8	Lib3-S
%33.9	%30.6	T22-S
%35.6	%31.3	Tp1-S
%0.0	%0.0	*S. sclerotiorum*

شكل1. تأثير التضاد المباشر لعزلات *Trichoderma* (Lib1، Lib2، Lib3، T22وTp1) على نمو وتكوين الأجسام الحجرية لفطر *Sclerotinia sclerotiorum*. بعمر 7 أيام عند درجة 25^{0}م.



شكل(2) تأثير التضاد المباشر لعزلات *Trichoderma* (lib1، lib2، lib3، T22 و Tp1) على نمو وتكوين الأجسام الحجرية لفطر *Sclerotinia sclerotiorum.* بعمر 7 أيام عند درجة 20^{0}م

بينت النتائـج أن أعلى نسبة تثبيط لتكوين الأجسام الحجرية كانت في معاملات T22، Lib2، Lib1 و Lib 3 مقارنة بالمعاملة Tp1 عند درجة حرارة 25°م (شكل 3). تتفق هذه النتائج مع نتائج Huang وErickson (2008) و(2010) Amine *et al.,* . سجل تباين غير معنوي ما بين العزلات (Lib1، Lib2، Lib3، T22) في تثبيط تكوين الأجسام الحجرية لفطر *Sclerotinia* الذي قد يعزى إلى تنوع آليات التضاد وتأثير درجات الحرارة في تكوين الفطر للأجسام الحجرية. لقد درس تأثير درجات الحرارة 20 و 25 °م على معدل إنتاج الأجسام الحجرية لفطر*Sclerotinia* ومعدل إنتاج الأبواغ الكونيدية لفطر*Trichoderma* لنفس العزلات المختبرة في الدراسة الحالية كلٌ على حدة؛ حيث بينت النتائج عدم وجود تأثير معنوي لدرجتي الحرارة 20، 25**0**م على معدل إنتاج أبواغ عزلات فطر *Trichoderma* بينما سجل فرق معنوي في معدل إنتاج الأجسام الحجرية، وكان متوسط عدد الأجسام الحجرية أعلى عند درجة الحرارة 25°م (شليبك، 2013). من المعروف أن لسلالات فطر *Trichoderma* آليات تضاد متنوعة من ضمنها التطفل الفطري (Mycoparasitism) حيث تلتف حول الطفيل وتفرز إنزيمات تعمل على تحلل الجدار أثناء عملية التطفل، وبعضها لا يسلك سلوكاً طفيلياً، بل تنتج عند تفاعلها مع الكائن الممرض مضادات حيوية (Vinali *et al.,* 2004). أوضحت نتائج دراسة آليات تضاد العزلات Lib1، Lib2، Lib3، T22، Tp1 قدرة عزلات الترايكوديرما على التطفل الفطري المباشر والتضاد غير المباشر مع فطر *S. sclerotiorum* (شليبك، 2013) وفطريات أخرى ممرضة للنبات (Duzan *et al.,* 2007a).

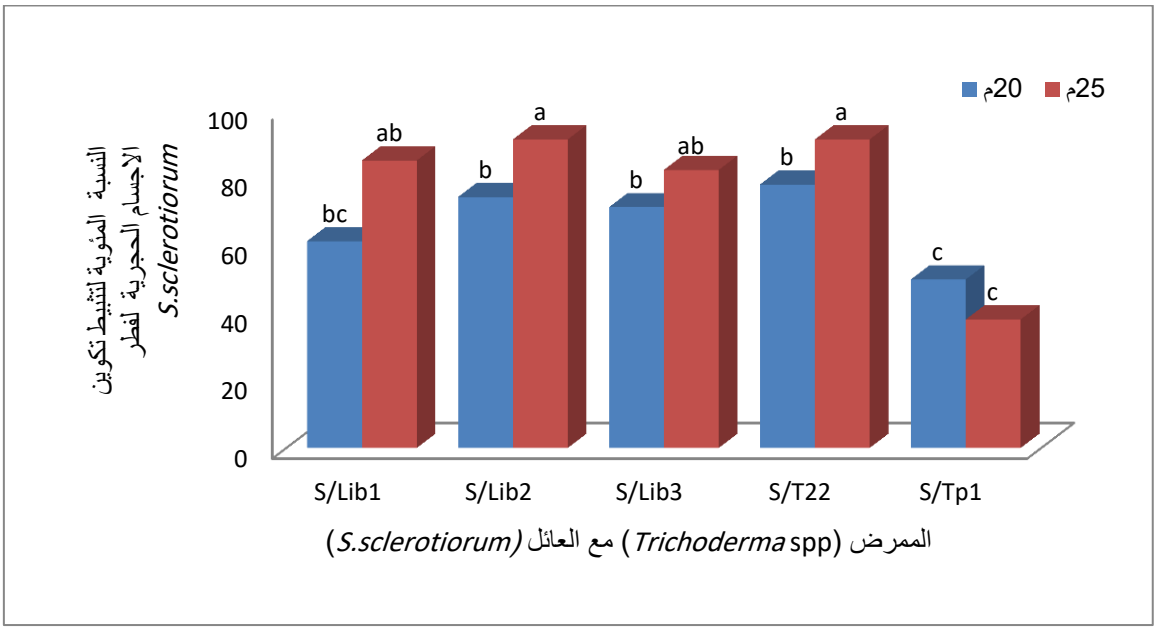
إثبات الامراضية لفطر *S. Sclerotiorum* على بذور البازلاء:

أوضحت النتائج تفاوت نسب إصابة بذور البازلاء المعاملة بفطر *S. sclerotiorum* (قطر 7مم، 14مم) والبذور المعاملة بالجسم الحجري (Sclerotium) حيث كانت أعلى نسبة إصابة 86% للبذور المعاملة بقرص 14مم من الفطر الممرض، وأقل نسبة إصابة 73% للبذور المعاملة بالجسم الحجري (شكل 4)، بينما كانت نتائج سلم تقييم المرض (قياس العدائية) على أطباق بتري متساوية تقريباً للبذور المعاملة بقرص قطره 7مم، وبالجسم الحجري للفطر الممرض، بينت النتائج - أيضاً - أن أعلى نسبة لموت البذور قبل وبعد الإنبات كانت للبذور المعاملة بالجسم الحجري، حيث بلغت 47 %، و 43 % في البذور المعاملة بقرص 14 مم و كانت أقل نسبة 40 % في البذور المعاملة بقرص 7 مم من فطر السكليروتينيا. تتفق هذه النتائج مع دراسة AL-Abadalla (2010)، حيث سجل موت بذور اللوبيا قبل وبعد الإنبات بنسبة 40 % عند معاملتها بفطر *S. sclerotiorum* ظهرت أعراض إصابة بذور البازلاء المعاملة بفطر *S. Sclerotiorum* (شكل 5) والتي تتمثل في موت البادرات قبل وبعد الإنبات، وقصر في طول الجذير، وتغير في اللون وتحلل في غلاف البذرة، ويرجح أن يكون السبب حدوث تداخلات ما بين المركبات النيتروجينية ونواتج السكريات وزيادة مستوى تحفيز نشاط إنزيمات Peroxidase وأكسدة المركبات الفينولية في المراحل الأولى من إنبات البذور (Bothast, 1978).

تأثير الفطر الممرض *S. sclerotiorum* على إنبات بذور البازلاء المعاملة بعزلات *Trichoderma* لمدة 12 و 24 ساعة:

أثرت عزلات Lib1، Lib2 على معدل إنبات البذور، حيث بلغت نسبة الإنبات 96.6 % في المعاملتين (شكل 6)، بينما كانت أقل نسبة إنبات 43% وأعلى نسبة إصابة 57% للبذور المعاملة بالعزلة T22 ولمدة 24 ساعة (شكل 7)، كما تبين أن طول فترتي المعاملة 12 و 24 ساعة لبذور البازلاء بالعزلات Lib1،Lib2، T22، Tp1 قبل نقلها إلى أطباق المعاملات وحقنها بالفطر الممرض *S. sclerotiorum* لم تؤثر في نسب الإصابة، بينما انخفضت نسبة الإصابة في البذور المعاملة لمدة 24 ساعة بالعزلة Lib3 شكل (7). سجلت نتائج دراسة أخرى أجراها (Abadi *et al.,* 2017) تحفيز البذور

على الإنبات وخفض معدل إصابة البادرات بالفطر الممرض *Botrytis cinerea* عند معاملة بذور نبات الخس بنفس عزلات *Trichoderma* المختبرة في هذه الدراسة، ورجح أن يكون السبب تأثير المركبات التي تفرزها العزلات المحلية من فطر *Trichoderma*. لم تسجل فروقاً معنوية بين المعاملات، حيث أوضحت نتائج تحليل البيانات في اختبار مربع كاي للاستقلالية عدم وجود دلالة إحصائية واضحة بين زمن المعاملة بعزلات فطر الترايكوديرما ونسبة إنبات البذور ومعدل الإصابة بفطر *S. sclerotiorum* عند مستوى معنوية ($P<0.05$). وقد يعزى غياب هذه العلاقة إلى المعاملة المسبقة لبذور البازلاء بعزلات الترايكوديرما في غياب الفطر الممرض؛ أي: عدم حدوث تداخل بين الفطرين. إن تحفيز المقاومة في النبات وتثبيط الكائن الممرض يتطلب تداخل ثلاثي بين النبات والترايكوديرما والكائن الممرض، حيث تنطلق جزيئات Elicitors من *Trichoderma* تستحث إنتاج إنزيمات Proteinase ، Chitinase، Galacturonidase من النبات تعمل على تثبيط نمو الفطر الممرض للنبات (Woo and Lorito, 2006). تتفق هذه النتائج مع نتائج الدراسات التي أجراها كلٌ من Hadar *et al.*, (1979) و Handoro *et al.*, (2002) التي بينت أن استعمال فطر *T. harzianum* أدى إلى خفض نسبة الإصابة بفطر *S. sclerotiorum*. تم استخلاص وتعريف المركبات الطبيعية Lipopeptaibols من العزلة المحلية (Lib1) المشابهة لـ Trichogin A IVJ (Duzan *et al.*, 2007 b).

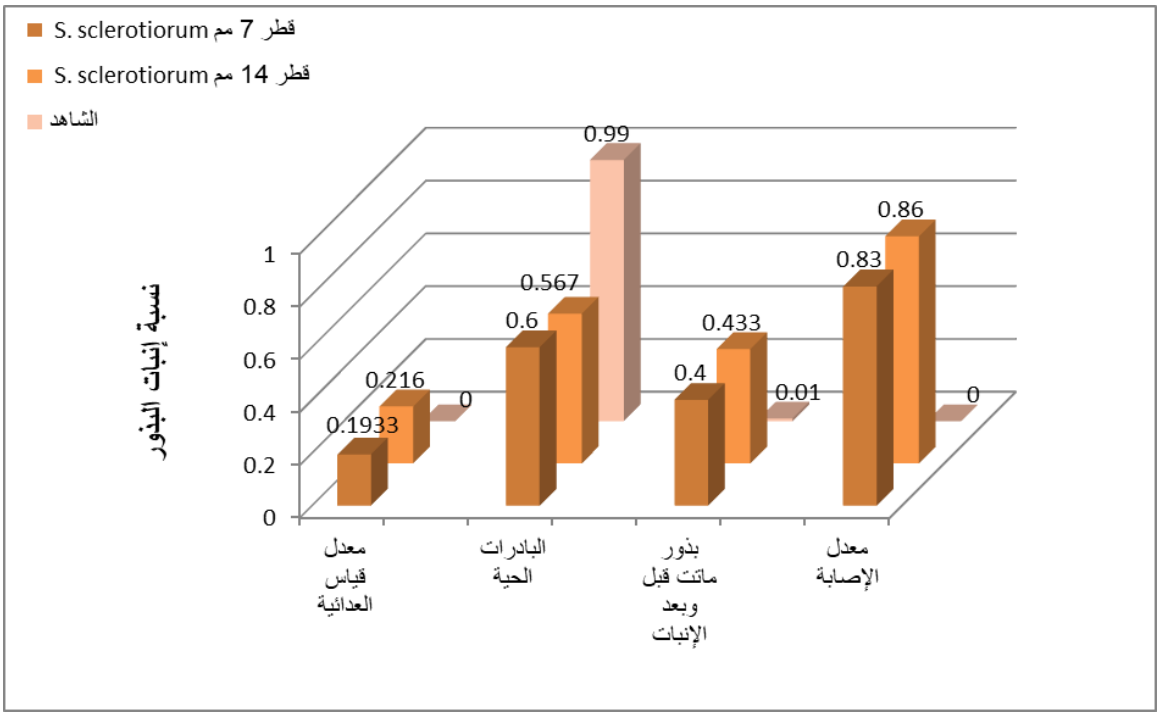


شكل (3) تأثير التضاد المباشر لعزلات *Trichoderma* على تكوين الأجسام الحجرية لفطر *Sclerotinia sclerotiorum*. عند درجتي حرارة 25و20 ^{0}م.

جدول 2. متوسطات أعداد الأجسام الحجرية ودرجة التضاد لعزلات *Trichoderma* مع فطر *Sclerotinia sclerotiorum*. ودرجة التضاد عند درجتي حرارة 20 و 25°م

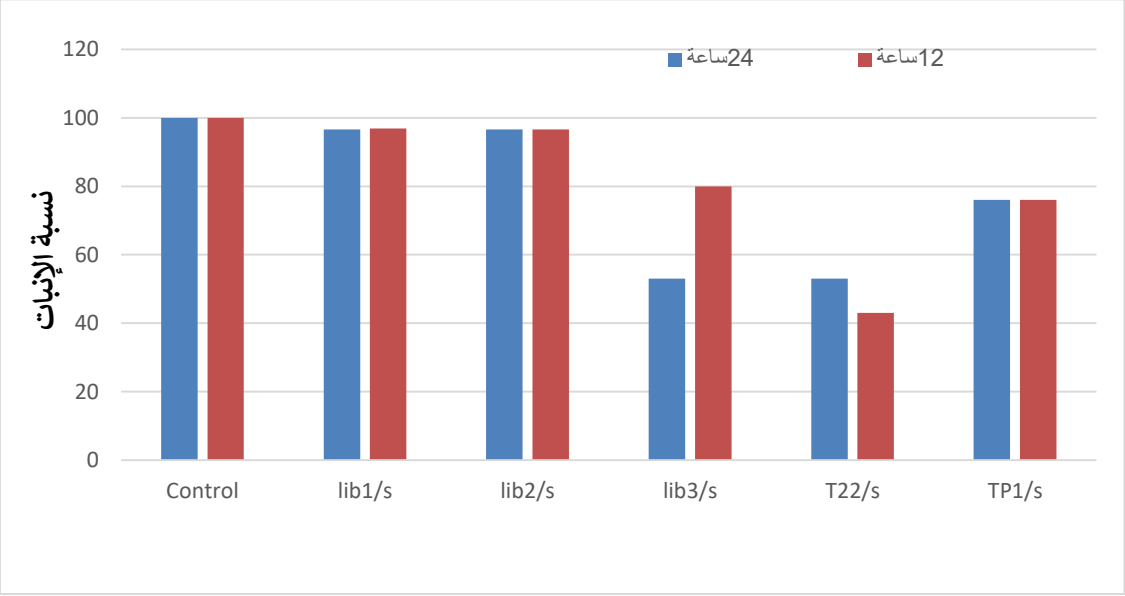
عزلة الفطر	متوسطات أعداد الأجسام الحجرية عند درجة 20°م	نسبة التثبيط % عند درجة 20°م	درجة التضاد عند 20°م	متوسطات أعداد الاجسام الحجرية عند درجة 25°م	نسبة التثبيط % عند درجة 25°م	درجة التضاد عند 25°م
Lib1	3.5	bc 61%	3	1.65	ab 85%	2
Lib2	2.33	b 74%	2	0.988	a 91%	1
Lib3	2.6	b71%	2	2	ab 82%	2
T22	3	b77.7%	2	0.97	a 91%	1
Tp1	2	c 49.7%	4	6.77	c 38%	4
S. sclerotiorum	8.95			10.9		

a,b,c: القيم التي تشترك في حرف واحد أو أكثر لا توجد بينهم فروقاً معنوية HSDTukey (P<0.05)



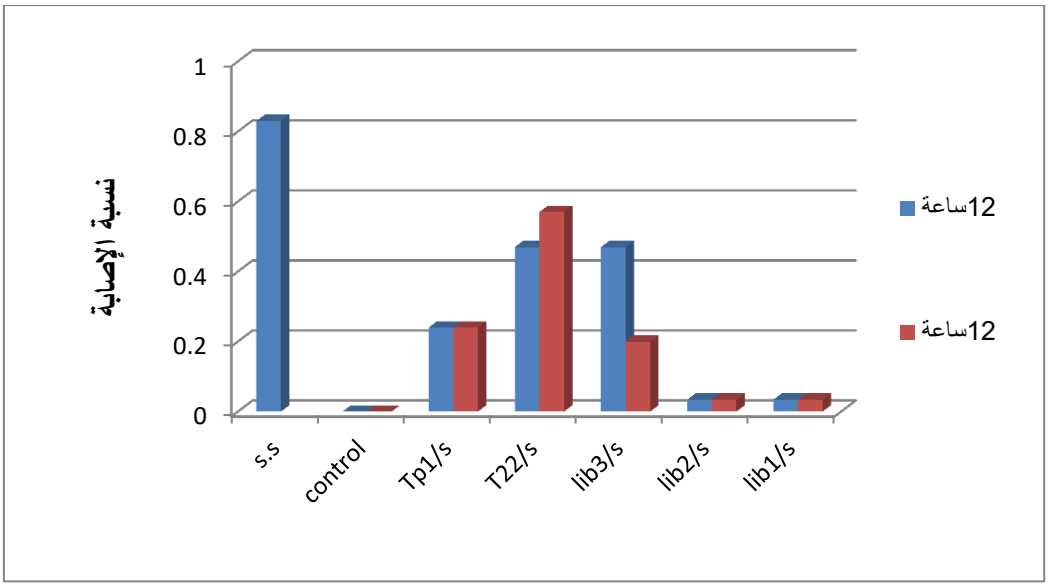
شكل 4. تأثير الإصابة بفطر *Sclerotinia sclerotiorum*. على معدل إنبات بذور البازلاء

شكل5. أعراض إصابة بذور البازلاء الملوثة بقرص قطره 7مم بفطر *Sclerotinia sclerotiorum.* بعمر 5-7 أيام.



شكل6. تأثير فطر *Sclerotinia sclerotiorum* على معدل إنبات بذور البازلاء المعاملة بعزلات *Trichoderma* لمدة 12، 24 ساعة.

المجلة الليبية للعلوم الزراعية، المجلد (26)، العدد (1) 2021: 17-32



شكل7. تأثير الفطر الممرض *Sclerotinia sclerotiorum* على إصابة بذور البازلاء المعاملة مسبقاً بعزلات *Trichoderma* لمدة 12، 24 ساعة.

الاستنتاج

أظهرت نتائج هذه الدراسة تباين تأثير عزلات فطر الترايكوديرما المختبرة على معدل النمو القطري للفطر سكليروتينيا وتكوين الأجسام الحجرية في التضاد المباشر عند درجتي حرارة 20 و 25 °م حيث كان التأثير معنوي على معدل تثبيط تكوين الأجسام الحجرية في معاملات (Lib1، Lib2، Lib3، T22) وانخفض معنوياً في معاملة Tp1 وكانت العزلة التجارية T22 والمحلية Lib2 أعلى كفاءة وبدرجة تضاد (1). لم يكن لمعاملات عزلات الترايكوديرما تأثير معنوي في تثبيط النمو القطري للميسيليوم عند درجتي الحرارة 20 و 25 °م. لم تسجل فروقاً معنوية في تأثير زمن المعاملة (12، 24 ساعة) على نسبة إنبات البذور وتحفيزها على مقاومة الإصابة بالفطر الممرض سكليروتينيا. يقترح إجراء دراسات مستقبلية في الحقل لتقييم فعالية العزلات المحلية من *Trichoderma* في مكافحة الفطر الممرض *S. sclerotiorum* وفطريات أخرى تصيب محاصيل اقتصادية في البيئة الليبية.

شكروتقدير

يتقدم الباحثون بجزيل الشكر والعرفان للسيد/ أ.د. صالح الهادي الشريف الأستاذ بقسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة طرابلس على منح العزلة *Sclerotinia sclerotiorum*، والسيد/ د. خالد محمد بن نصر الأستاذ بقسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة طرابلس على المساهمة في التحليل الإحصائي لنتائج الدراسة.

المراجع

أبو عرقوب، محمود موسى.2000. المقاومة الحيوية لأمراض النبات. المكتبة الأكاديمية، القاهرة. 684 صفحة.

اسطفيان، زهير عزيز، محمد صادق حسن وإبراهيم خليل حسون. 2002. فعالية مبيد الفينواميفوس وفطري *Trichoderma harzianum* Rifani و*Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson وبعض مضافات التربة العضوية في مكافحة المعقد المرضي لنيماتودا تعقد الجذور و أمراض الذبول على الباذنجان. مجلة وقاية النبات العربية 20(1): 1-5.

الشعبي، صلاح ولينا مطرود. 2002. دراسة مختبرية لتقويم فاعلية عزلات مختلفة من أنواع فطر التريكودرما تجاه بعض الفطريات الممرضة المنقولة بالتربة. مجلة وقاية النبات العربية. 20: 77 – 83.

أبو رغدة، هدى ولويزة سيدهومي. 2003. المكافحة الحيوية لمرض تعفن جذور نبات القمح باستعمال عزلات من الفطر *Trichoderma longibrachiatum*. مجلة وقاية النبات. 2: 159.

العربي، خديجة فرج، نورية علي العامري وريما مختار الصقر. 2013. اختبار تأثيرات عزلتين من فطر *Trichoderma* spp. على نمو وتطور عزلات محلية للكائن المسبب لمرض العفن القطني *Sclerotinia sclerotiorum*. كتاب وقائع المؤتمر الوطني السادس للتقنيات الحيوية، جامعة مصراتة. 158 – 173.

الغرياني، نجاة خليفة، خديجة فرج العربي ، نورية علي العامري، منى محمد فريوان، خيرية محمد ذياب، عواطف محمد الرياني والزروق أحمد الدنقلي. 2009. تأثير فاعلية راشح عزلات فطر *Trichoderma* المحلية على بعض الفطريات الممرضة لأشجار نخيل التمر بليبيا. وقائع مؤتمر التقنيات الحيوية الخامس – صبراته- ليبيا. مارس 21- 23.

الغويل، حميدة سالم. 2019. تأثير فطر *Trichoderma* spp. والسماد العضوي (Compost) على عزلات فطر *Rhizoctonia solani* K. المسبب لمرض القشرة السوداء على البطاطس. رسالة ماجستير. قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة طرابلس، ليبيا.

شليبك، عواطف علي. 2013. المكافحة الحيوية باستخدام عزلات محلية لفطر *Trichoderma* spp. ضد فطر *Sclerotinia sclerotiorum* رسالة ماجستير. قسم علم النبات، كلية العلوم، جامعة طرابلس، ليبيا.

Abadi, K.; Duzan, H.; El-Gamudi, F.; Kashoor, M. and Lorito, M. 2017. Effect of Libyan *Trichoderma* isolated on plant growth and their potential in induction of systemic resistance in Tomato (*Solanum lycopersicun*) infected with *Botrytis cinerea*. Journal of Agricultural and Biological Sciences. 3 (1):85-93

Abawi, G. S. and Grogan, R. G. 1975. Source of primary inoculums and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum.* Phytopathology. 65: 300 - 309.

AL-Abadalla, A. 2010. Pathogenicity of fungi associated with leguminous seeds in Eastern Kingdom of Saudi Arabia. African journal of Agricultural research .(5)10: 1117-1126.

Amine, F.; Razdan, V.; Mohiddin, F.; Bati K. and Banday, S. 2010. Potential of *Trichoderma* species as biocontrol agents of soil borne fungal propagules. Journal of Phytology 10: 38-41.

Koninginin A: a novel plant regulator from *Trichoderma koningii*. Agricultural and Biological Chemistry 53: 2605–2611.

Duzan, H.; Abadi, k.; Sghaier, S.; EL-Gamudi, F.; Khushoor M. and Al- Basheer, A. 2007(a). *In vitro* interactions of *Trichoderma* isolates (two local and three non- local standards) with *Rhizoctonia* sp. And *Fusarium* sp. (Poster presentation). The Fourth Conference of Biotechnology, April 21-23, Benghazi, Libya.

Duzan, H.; Abadi, k.; Vinali, F.; Turra, D.; Sghaier, S.; El-Gamudi, F.; Khushoor, M.; Al-Basheer, A. and Lorito, M. 2007(b). Characterization of Libyan Trichoderma strains and their *in vitro* interations with *Rhizoctonia* sp. and *Fusarium* sp. XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (poster), July 21-27, Sorrento, Italy.

Edington, L.; Khew, K. and Barron, G. 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology 61: 42- 44.

Hadar, Y.; Chet, I. and Henis, Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69: 64 - 68.

Handoro, F.; Sandhu,. S.; Singh, R. and Singh, p. 2002. Biological control of white rot *Sclerotinia sclerotiorum* of pea *pisum sativum* L. Journal of research 39 (3): 382-390.

Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84: 377-393.

Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control

Bell, D.; Wells, H. and Markham, C. 1982. The *in vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72:379-382.

Bolton, M. D.; Thomma, B.; Nelson, B. D. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Molecular Plant Pathology. 7(1): 1–16.

Bothast, R. 1978. Fungal deterioration and released phenomenal in cereals, legumes and oil seeds. Phytopathology 73: 312-315.

Brenner, M. L. 1981. Modern methods for plant growth substances analysis. Annual Review of Plant Physiology 32: 511–538.

Chet, I. 1987. Trichoderma. Application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soil-borne pathogenic fungi. In; CHET, I. (ed.). Innovative Approaches to Plant Disease Control, pp. 137-160. ,John Wiley & Sons, New York, USA.

Clarkson, J. P.; Phelps, K.; Whipps, J. M.; Young, C.S.; Smith, J. A. and Watling, M. 2004. Forecasting Sclerotinia disease on Lettuce: Toward developing a prediction model for carpogenic germination of sclerotia. Phytopathology. 94:268-279.

Cutler, H. G.; Cox, R. H.; Crumley, F. G. and Cole, P. D. 1986(a). 6-Pentyl-apyrone from *Trichoderma harzianum*: its plant growth inhibitory and antimicrobial properties. Agricultural and Biological Chemistry 50: 2943–2945.

Cutler, H. G.; Himmetsbach, D. S.; Arrendale, R. F.; Cole, P. D. and Cox, R. H. 1989(b).

362. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Vinale, F.; D'Ambrosio, G.; Abadi, K.; Scala, F.; Marra, R.; Turra, D.; Woo, S . L. and Lorito, M. 2004. Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. Journal of Zhejiang University Science. 30: 2– 8.

Weinding, R. 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum*on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. Phytopathology 24: 1153 -1179.

Woo, S. and Lorito, M. 2006. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management. Journal Gressel springer the Netherlands. 107-130.

Zhang, B. and X, Yang. 2000. Pathogenicity of *Pythium* populations from corn soybean rotation fields. Plant Disease, 84: 94 - 99.

of plant diseases: The History and Evolution of Current Concepts. The American Phytopathological Society, Plant disease. 87 (1): 4-10.

Huang, H. and Erickson, R. 2008. Factors effecting biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungal Antagonists. Phytopathology 156: 628 - 634.

Inbar, J.; Menedez, A.; Chet, I. 1996. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. Soil Biology and Biochemistry. 28: 757-763.

Mahmood, I.; Imadi, S. R.; Shazadi, K.; Gul, A. and Hakeem, K. R. 2016. Effects of Pesticides on Environment. In: Hakeem K., Akhtar M., Abdullah S. (eds) Plant, Soil and Microbes. (1): 253 - 269.

Saharan, G. S. and Mehta, N. 2008. *Sclerotinia* diseases of crop plants: Biology, Ecology and Disease Management. Springer, Dordrecht. 486 pp.

Sendecor, G. W. and Cochran, W. G. 1980. Statistical Methods. 7th. Ed. Iowa State. Univ. Press. Ames, Iowa. USA.

Talagiba, J. da S.; Maffia, L. A.; Barreto, R.W.; Alfenas, A. C. and Sutton, J. C. 1998. Biological control of *Botryits cinerea* in residues and flowers of rose (Rosa hybrids). Phytoparasitica. 26(1): 8 -19.

Tronsmo, A. 1986. Use of *Trichoderma* spp, in biological control of necrotrophic pathogens. In; Fokkema, N. J,, and J, van den Heuvel, (eds), Microbiology of the Phyllosphere, pp. 348 -

THE LIBYAN JOURNAL OF AGRICULTURE
Volume (26), No. (1), 2021: 17 -32

Original Article

Antagonistic effect of three locally isolated and two commercial *Trichoderma* isolates against *Sclerotinia sclerotiorum*

Awatef Ali shlibak[1], *Haifa Mohamed Duzan[2], Nuria Ali Elamri[2],
Entisar Ali Elgmati[3], Abdulnabi Mohamed Abughania[4].

1- Biotechnology Research Centre 2- Plant Protection Dep. – Fac. of Agriculture- Univ. of Tripoli
3- Dep. of Statistics- Fac. of Science- Univ. of Tripoli 4- Dep. of Botany – Fac. of Science-Univ. of Tripoli.

ABSTRACT

A laboratory study was conducted to evaluate the ability of three locally isolated *Trichoderma* spp., *T. longibrachiatum* UAMH7955 (Lib1), *T. harzianum* (Lib2) and *T. longibrachiatum* UAMH7956 (Lib3) and two commercial *T. harzianum* ATCC 20847 (T22), *T. atroviride* ATCC 74058 (Tp1) to antagonize *Sclerotinia sclerotiorum* at 20, 25°C. Results showed the effect of *Trichoderma* isolates in the inhibition of mycelium growth and sclerotia formation of *S. sclerotiorum*at 20, 25°C. The highest numerical inhibition rate 55% and 45% of *S. sclerotiorum* mycelium growth was caused by Lib1 and Lib3 at 25°C, respectively. While, similar antagonistic range 30 -40% was reported for all *Trichodema* isolates At 20°C, on the other hand, Lib1, Lib2, Lib3, and T22 were able to inhibit sclerotia formation at 25°C compared to Tp1. The lowest inhibition of sclerotia formation 60% and 49.7% was reported for Lib1 and Tp1 treatments at 20°C. Significant inhibition rate (71, 77.7, 91, 91%) was caused by Lib2, T22 at 20 and 25°C, respectively. Effect of the antagonistic fungi on germination of pea seeds (local variety) pretreated with *Trichoderma* isolates and seedlings infection rate after 12 and 24 h. was also tested, 96.9% of seed germination treated with Lib1, Lib2 was reported and 76% for Tp1. Lower seedlings infection rate by *S. sclerotiorum* was also reported.

Key words: Biological control, Mycoparasitism, *Trichoderma, Sclerotinia sclerotiorum*

***Corresponding Author: Haifa Duzan, Plant Proteection Dep. Faculty of Agric. Univ. of Tripoli - Libya.**
Phone: +218913229830 e-mail: h.duzan@uot.edu.ly

Received: 16/12/2020 Accepted: 12 /4/ 2021