المجلة الليبية للعلوم الزراعية
المجلد (15) العدد (1) 2010

ورقة أصيلة

عزل وتعريف مبدئي لبعض عوامل المكافحة الأحيائية للنيماتودا المتطفلة على النبات تحت الظروف الحقلية في بعض المناطق الغربية من ليبيا

خليفة حسين دعباج، صالح الهادي الشريف

قسم وقاية النبات ـ كلية الزراعة ـ جامعة الفاتح.

الملخص

من خلال الفحص الدوري لمعلقات النيماتودا من بعض الترب، تم التقاط عينات نيماتودا ميتة، وبعد غسلها بماء مقطر ومعقم، نقلت إلى أطباق بتري تحتوي على آجار دكستروز البطاطس (PDA). بعد فترة تحضين من 3-7 أيام، شوهدت نموات فطرية، ومن خلال الفحص المجهري تم التعرف على الفطريات التالية *Alternaria* sp. على الجنس *Xiphinema* sp.؛ و *Cladosporium* sp. على الجنس *Longidorus* sp.؛ و *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* على النوع *Heterodera cruciferae*؛ و*Paecilomyces varotii* على الجنس *Paratrichodorus* sp. والجنس *Xiphinema* sp.؛ و *Verticillium chlamydosporium* على أكياس بيض نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne javanica*. تم تحضير عزلات نقية من كل عينة فطرية، واختبر منها تحت الظروف المعملية تأثير فطر *F.oxysporum* f.sp. *conglutinans* على نيماتودا حوصلات الصليبيات *H. cruciferae* وتبين أن هذه العزلة تغزو جميع أطوار النيماتودا. بالإضافة إلى أجناس الفطور السابقة، تم التعرف على البكتريا الخيطية *Pasteuria penetrans* على أطوار البيض، والحدث الثاني (J_2) والإناث البالغة لنيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne javanica*، من أكثر من حقل، و*Pasteuria* sp. على الطور البالغ للنيماتودا الحلزونية *Rotylenchus* sp. من منطقة النوفليين بطرابلس.

الكلمات الدالة: المكافحة الأحيائية، النيماتودا، اطباق بتري.

المقدمة

يوجد العديد من الأعداء الطبيعية التي تهاجم النيماتودا المتطفلة على النبات في التربة وتقلل من كثافتها[9، 13، 14، 17، 20]. وظاهرة انخفاض عشائر النيماتودا ظاهرة طبيعية أشار إليها العديد من العلماء[9، 11، 14، 17، 26]. لذلك من المهم تحديد أماكن تواجد هذه الأعداء الطبيعية ومحاولة استخدامها كعوامل مكافحة أحيائية للحد من الأضرار المتسببة عن النيماتودا على المحاصيل الزراعية لزيادة الإنتاج

للإتصال: **خليفة حسين دعباج**
هاتف: 2962 502 92 218+
استلمت بتاريخ:

قسم وقاية النبات- كلية الزراعة - جامعة الفاتح
بريد إلكتروني: dabajhk@yahoo.com
اجيزت بتاريخ:

الزراعي[6، 7، 12].

بالرغم من إجراء العديد من الأبحاث حول تأثير عوامل المكافحة الأحيائية على النيماتودا المرضة للنبات، وتحقيق نتائج إيجابية من قبل العديد من الباحثين في كثير من مناطق العالم[4، 5، 7، 9، 11، 12، 15، 18، 25]، كما دلت نتائج عديد من الأبحاث على تقليل الضرر الناجم عن الإصابة بالنيماتودا على العديد من المحاصيل وبصورة خاصة نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp.، ونيماتودا الحوصلات *Heterodera* spp.[4، 5، 6، 7، 14، 23]. فإنه لم يتم تطبيق استخدام عوامل المكافحة للنيماتودا على نطاق واسع من العالم.

تركزت معظم الدراسات على طور البيض لأنه أكثر عرضة للإصابة بعوامل المكافحة الأحيائية، كما أن إصابة طور الإناث غير البالغة يقلل من إنتاجها للبيض، وبالتالي فإن كفاءة هذه العوامل تكون أفضل في حالة إصابتها لأطوار الإناث والبيض حال خروجها من الجذور مباشرة[4، 6، 12، 14]. ومن أهم الفطريات التي تمت دراستها كعوامل مكافحة أحيائية في الزراعات المحمية وتحت الظروف الحقلية الفطر *Paecilomyces lilacinus* الذي تم استخدامه تحت الظروف الحقلية في مناطق جغرافية مختلفة[4، 5، 7، 12]، وأعطى كفاءة عالية في مكافحة نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. ونيماتودا الحوصلات *Golobodera pallida*، حيث قلل من الضرر الناجم عن الإصابة بالنيماتودا[4، 12]، وبالتالي زيادة الإنتاج الزراعي لعدة محاصيل زراعية هامة[5، 7، 12]، بالرغم من أن بعض النتائج لم تكن إيجابية لوجود اختلافات بين العزلات المختلفة لهذا الفطر[4، 5]. كما أن هناك عدداً آخر من الفطريات التي تتطفل على النيماتودا منها الفطر *Arthrobotrys* sp. الذي أجريت عليه العديد من الدراسات[3، 17]، والفطر *Verticillium chlamydosporium* الذي يتطفل بنسبة 50 - 90% على طور البيض لنيماتودا تعقد الجذور ونيماتودا الحوصلات تحت الظروف الحقلية[14، 15].

من عوامل المكافحة الأحيائية التي تبشر بمستقبل واعد البكتريا الخيطية *Pasteuria penetrans*، وهي من المتطفلات الداخلية الإجبارية على بعض أنواع النيماتودا الممرضة للنبات وخاصة نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. [6، 16، 22، 23، 26]. والهدف من هذه الأبحاث هو إضافة هذه الكائنات إلى الترب الزراعية التي لم تستوطنها من قبل بصورة تستطيع أن تثبت نفسها لتحقق مكافحة طبيعية[13، 22].

تعتبر النيماتودا المتطفلة على النبات في ليبيا أحد أهم مسببات الأمراض لمعظم المحاصيل الزراعية وخاصة نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. ونيماتودا الحوصلات *Heterodera* spp.[8]، بالإضافة إلى عدة أجناس وأنواع أخرى، وبمراجعة الدراسات السابقة حول استخدام عوامل المكافحة الأحيائية في الجماهيرية تبين أن هناك دراسة واحدة عن الفطريات المتطفلة على النيماتودا[11]، وأخرى حول مكافحة أمراض ذبول القرنفل المتسبب عن نيماتودا تعقد الجذور باستخدام البكتريا[1].

ونظرا لأهمية إيجاد بدائل لطرق المكافحة الكيميائية فإن الهدف من هذه الدراسة هو الكشف عن وجود وانتشار عوامل المكافحة الأحيائية تحت الظروف الطبيعية، ومحاولة تعريفها مبدئيا، وإجراء بعض الاختبارات على بعض منها تحت الظروف المعملية تمهيدا لاستخدامها في تجارب أخرى تحت الظروف الحقلية أو تحت نظام الزراعة المحمية في المستقبل.

المواد وطرائق البحث

تم جمع عينات تربة وجذور من عدة حقول زراعية حول مدينة طرابلس بالمنطقة الغربية من الجماهيرية. وفي المختبر تم استخلاص النيماتودا بطريقة الغرابيل أو أقماع برمان من عينات التربة، كما تم فحص الجذور بعد غسلها بالماء بالعين المجردة للكشف عن أعراض نيماتودا تعقد الجذور وأكياس البيض أو فحصها تحت مجهر اللقط بعد تقطيعها في طبق بتري صغير به قطرات ماء، للكشف عن النيماتودا المتطفلة داخليا أو شبه داخليا. وخلال الفحص المجهري لمعلقات النيماتودا للتعرف على الأجناس والأنواع،

تم لقط عينات النيماتودا التي تظهر عليها أعراض الإصابة بالكائنات الحية الدقيقة، ونقلها إلى شريحة مقعرة تحتوي على محلول هيبوكلورات الصوديوم 1% لمدة 30 ثانية لتعقيمها سطحيا، ثم نقلها إلى شريحة أخرى مقعرة تحتوي على ماء مقطر ومعقم لغسل العينة من آثار هيبوكلورات الصوديوم، ثم نقل العينة إلى طبق بتري يحتوي على بيئة أجار دكستروز البطاطس (PDA)، ووضعها في حضان عند درجة حرارة 25 ْم لمدة 3-7 أيام، بعدها تفحص الأطباق للكشف عن نمو الكائنات الدقيقة، وتحضير شرائح مجهرية للتعرف على الفطريات عن طريق المقارنة بمساعدة المرجع (3). ثم تحضير مزارع نقية منها بنقل غزل الفطر أو نقل بوغ واحد نام من معلق الفطر، ووضعها في حضان حتى يتم النمو، ثم تحفظ في برادة عند درجة حرارة 5 ْم، وتجدد المزرعة من حين لآخر. وفي بعض الأحيان يتم تحضير شرائح من الفطر أو البكتريا الخيطية مباشرة من أحد أطوار نيماتودا تعقد الجذور ونيماتودا الحوصلات عند الإصابة الشديدة وخاصة أكياس البيض والحوصلات، وقد تم بعض الاختبارات المعملية على بعض من هذه العوامل وهي:

1 - الفطر المعزول من نيماتودا حوصلات الصليبيات:

بعد عزل الفطر من أطوار الحوصلات،الإناث والحدث الثاني (J_2) المصابة مباشرة من الحقل في مزرعة نقية على آجار دكستروز البطاطس(PDA) تم تحضير معلق من الفطر، وأضيفت قطرات من المعلق إلى شرائح زجاجية ملصق عليها حلقة من البلاستيك في المنتصف تحتوي على معلق به عدد خمس من كل من أطوار الإناث، الحوصلات أو أكياس البيض أو 10 أفراد من طور الحدث الثاني (J_2) لنيماتودا حوصلات الصليبيات *Heterodera cruciferae* استخلصت من جذور نبات كرنب زهرة (القرنبيط) *Brassica oleracae* var capitat صنف «Snow Ball» من أحد الحقول بمنطقة النوفليين، في مدينة طرابلس، وتم فحص العينة كل 24 ساعة تحت المجهر المركب.

2 - البكتريا الخيطية:

تتميز عينات جذور النباتات المصابة بنيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. والتي تظهر عليها أعراض الإصابة بالبكتيريا الخيطية على أكياس البيض بوجود لون أصفر محمر أو أصفر أدكن، وتم فحص أطوار الإناث والأحداث وأكياس البيض للكشف عن الأبواغ الداخلية (endospores) للبكتريا للتعرف عليها عن طريق المقارنة[22]. جففت الجذور بعد غسلها بالماء وطحنت ثم حفظت في أكياس لدائن تحت ظروف جافة لتحضير وإكثار مصدر عدوى[25].

النتائج والمناقشة

يبين الجدول (1)، أجناس أو أنواع الفطريات والبكتريا الخيطية التي تم عزلها والتعرف عليها من أجناس وأنواع من النيماتودا وهي *Alternaria* spp. على الجنس *Xiphinema* sp.؛ و*Cladosporium* sp. على الجنس *Longidorus* sp.؛ و*Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* على النوع *Heterodera cruciferae*؛ و*Paecilomyces varotii* على الجنس *Paratrichodorus* sp. والجنس *Xiphinema* sp. و*Verticillium chlamydosporium* على أكياس بيض *Meloidogyne javanica*، بالإضافة إلى البكتريا الخيطية *Pasteuria penetrans* من أكياس بيض نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne javanica* و *Pasteuria* sp. على النيماتودا الحلزونية *Rotylenchus* sp.، من عدة مناطق زراعية مختلفة بالمنطقة الغربية من الجماهيرية، ويعتبر هذا أول تسجيل لهذه الأنواع الفطرية والبكتريا الخيطية على النيماتودا في الجماهيرية.

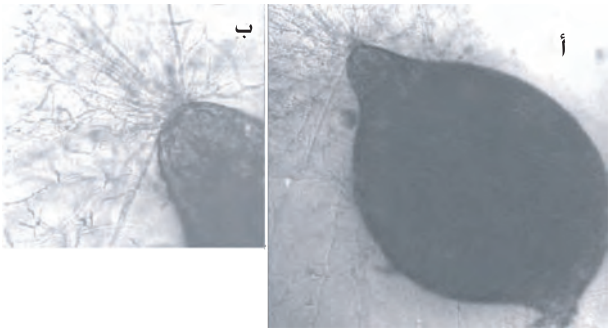
تبين من نتائج الدراسة وجود عوامل مكافحة إحيائية تحت الظروف الطبيعية منتشرة في عدة حقول، ففي منطقة النوفليين التي تشتهر بزراعة بعض الخضراوات وخاصة كرنب زهرة (القرنبيط) منذ أكثر من مائة سنة، وبينت دراسات سابقة [9] أن جميع حقول القرنبيط بها ملوثة بنيماتودا حوصلات الصليبيات *H. crucifirae*، إلا أنه بالرغم من ذلك فإن المزارعين مستمرون في زراعة هذا المحصول دون القيام بأي عمليات مكافحة كيميائية للنيماتودا لعدم إلمام المزارعين بأهمية هذه النيماتودا، ورغم ذلك يلاحظ أن

الجدول 1. بعض عوامل المكافحة الأحيائية المعزولة من عينات نيماتودا ممرضة للنبات من حقول مختلفة بالمناطق الغربية بالجماهيرية.

المنطقة	العائل	جنس / نوع النيماتودا	العامل الحيوي المعزول
أولا: الفطريات			
سيدي المصري	حمضيات	*Xiphinema* sp.	*Alternaria* sp.
تاجوراء	حمضيات	*Longidorus* sp.	*Cladosporium* sp.
النوفليين	قرنبيط	*Heterodera cruciferae*	*Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*
سيدي المصري	حمضيات	*Paratrichodorus* sp.	*Paecilomyces varotii*
تاجوراء		*Xiphinema* sp.	*Paecilomyces varotii*
جنزور	طماطم، فلفل	*Meloidogyne javanica*	*Verticillium chlamydosporium*
ثانيا: البكتيريا الخيطية			
جنزور	فلفل طماطم	*Meloidogyne javanica*	*Pasteuria penetrans*
قصر بن غشير	فلفل	*Meloidogyne javanica*	*Pasteuria penetrans*
النوفليين	تربة	*Rotylenchus* sp.	*Pasteuria* sp.

نمو النبات في الحقل جيد ولم تظهر عليه أعراض الإصابة بالنيماتودا، وهذا ربما يرجع للدور الذي تلعبه عوامل المكافحة الأحيائية وخاصة الفطر *Fusarium oxysporum f.sp.* coglatinans والبكتريا *Pasteuria penetrans*. حيث تم عزل الفطر من أطوار الحوصلة، والإناث البالغة، وأكياس البيض، وأطوار الحدث الثاني (J_2) من عينات حقلية ملوثة بدرجة شديدة. وتبين أن هذا الفطر ينمو على أطوار الحوصلات، والإناث، وأكياس البيض، والحدث الثاني عند إضافة معلق من أبواغ الفطر إلى معلق النيماتودا، كما هو مبين بالشكل (1 - أ، ب)، وتتفق هذه النتائج مع نتائج الدراسات[19،23] حول تأثير أبواغ عوامل المكافحة الأحيائية على الأطوار المختلفة للنيماتودا.

أما البكتريا الخيطية *P. penetrans* فقد لوحظت على أكياس بيض نيماتودا تعقد الجذور *M. javanica* في منطقتي قصر بن غشير وجنزور على نباتات طماطم، وفلفل، وباذنجان خلال الموسمين الزراعيين 96/95 و 97/96، حيث لوحظ إصابة جذور النباتات بمرض تعقد الجذور إلا أن نمو النبات والإنتاج لم يتأثرا كثيرا بالرغم من عدم قيام المزارعين بأية عمليات تعقيم للبيوت البلاستكية كما هو متعارف عليه في حالة الزراعات المحمية، وهذا ربما يرجع إلى وجود



الشكل 1. نمو فطر *Fusarium oxysporum* f.sp. congulatinus **على أنثى بالغة لنيماتودا حوصلات الصليبيات** *Heterodera cruciferae*. **(أ) طور أنثى بالغة (ب) تكبير لنمو الفطر عند منطقة رأس النيماتودا.**

عوامل المكافحة الطبيعية المشتركة بين البكتريا الخيطية *P. penetrans* والفطر *Verticillium chlamydosporium* واللذين يعملان على منع فقس البيض، وهذا ما أكدته الدراستان[16،18] من أن المكافحة المشتركة بعوامل المكافحة الإحيائية تعطي نتائج أفضل، مقارنة بكل منهما على حدة. كما دلت النتائج المعملية أن أكياس البيض المصابة بالفطر أو البكتيريا الخيطية لم يحصل فيها فقس مقارنة بأكياس بيض غير مصابة بعد مرور أكثر من 72 ساعة سواء المصابة طبيعيا أو في المختبر، مما يدل على فقد حيوية البيض بسبب

الإصابة بالعوامل الأحيائية، وهو ما أكدته عدة دراسات سابقة[4، 6، 12، 14، 15] حول ميكانيكية تأثير عوامل المكافحة الأحيائية على حيوية طور بيض النيماتودا.

كما لوحظ تحت المجهر التصاق أبواغ البكتيريا الخيطية *Pasteuria* sp. على جنس النيماتودا *Rotylenchus* sp. الذي يوجد بكثافة عالية في جميع عينات التربة بمنطقة النوفليين ولكن دون أن يكون لذلك تأثير على نمو نبات كرنب زهرة في الحقل. ومما تجدر الإشارة إليه أن المزارعين بالمنطقة المذكورة يقومون بإضافة كميات كبيرة من السماد العضوي قبل الزراعة بأسبوعين أو ثلاثة، مما قد يكون له دور فعال في تنشيط وتشجيع عوامل المكافحة الأحيائية للحد من الضرر المتسبب عن النيماتودا للمحصول تحت الظروف الحقلية.

من هذه الدراسة تبين أن هناك عدداً من عوامل المكافحة الأحيائية منتشرة بصورة طبيعية في الحقول المستديمة الزراعة بنوع متكرر من نفس المحصول، وهذا ما تشير إليه دراسات سابقة[6، 14] من أن الزراعة الفردية لمحصول معين تساعد على تخفيض حد الضرر المتسبب عن النيماتودا تحت الظروف الحقلية، خاصة نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. ونيماتودا الحوصلات *Heterodera* spp. حيث بينت الدراسات بأن حقول أشجار الخوخ على أصول قابلة للإصابة بنيماتودا تعقد الجذور لم تتأثر بنيماتودا تعقد الجذور والنيماتودا الحلقية بسبب وجود عدة عزلات من الفطريات على أعماق مختلفة[17، 24]. كما لوحظ انخفاض الضرر المتسبب عن نيماتودا تعقد الجذور *M.arenaria* في حقل نبات الفول السوداني المزروع بصورة منفردة على فترات متتالية بسبب تطفل الفطر *Paecilomyces lilacinus* على أكياس البيض بنسبة 50%[6].

لذلك ينصح بالاستمرار وتشجيع الأبحاث الخاصة بالبحث عن مصادر عوامل المكافحة الأحيائية وخاصة تلك التي تعزل من عينات نيماتودا ميتة[27] أو من أكياس البيض أو طور الحوصلة[12]، وإجراء الدراسات حول إمكانية تطبيقها في برامج المكافحة المتكاملة دون الاعتماد على المكافحة الكيميائية، حيث تؤكد الدراسات السابقة بأن استخدام عوامل المكافحة الأحيائية يكافئ أو يفوق استعمال المكافحة الكيميائية[5، 12، 15]، ولكن لا يجب أن ينظر إليها كبديل للمكافحة الكيميائية في المدى القريب، إلا بعد إيجاد تقنيات لإنتاجها بكميات وفيرة مع سهولة تطبيقها في الحقل وبأسعار مناسبة، وذلك بعد التأكد من سلامتها على الإنسان والبيئة.

المراجع

1. عزوز، عبد العزيز.1997. مقاومة جفاف القرنفل المتسبب عن نيماتودا تعقد الجذور باستخدام عزلة من البكتريا ازوتوباكتر.المؤتمر السادس لعلوم وقاية النبات 27-31 اكتوبر1997، بيروت لبنان.
2. Booth, C.1971. The genus *Fusarium*. Common wealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. pp. 273.
3. Cabanillas, E., K.R. Barker, and L.A. Nelson.1989. Growth of isolates of *Paecilomyces lilacinus* and their efficacy in biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato. J. Nematol. 21(2):164-172.
4. Davide, R.G.1988. Nematode problems affecting agricultures in the Philippines. J. Nematol. 20(2):214-218.
5. Dickson, D.W.; D.J. Mitchell ;T.E. Hewlett; M. Oostendorp and M. E. Kannwischer Mitchell.1991.Nematode - suppressive soil from a peanut field. J.Nematol. 23(4): 526. (Abstr.).
6. Dube, B.and G.C. Smart, Jr.1987. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. J.Nematol.19:222-227.
7. Edongali, E.A. and K.H. Dabaj. 1982. Cauliflower (*Brassica oleracae* cv.capitata) cyst nematode in Libya. Libyan J. Agric. 11:205-206.
8. Gintis, O.; B.G. Morgan-Jones and R. Rodriguiz-Kabana. 1983. Fungal colonization of young cysts of *Heterodera glycines* in soybean field soils. J.Nematol.14(4):460. (Abstr.).
9. Jaffe, B.G., and A.E. Muldoon. 1989. Suppression of cyst nematode by natural infestation of nematophagus fungus. J. Nematol. 21(4):505-510.
10. Jatala, P., R. Kaltenbach, M. Bocangel, A.J. Devaux and R. Campos. 1980. Field application of *Pacillomyces lilacinus* for controlling *Meloidogyne incognita* on potatoes. J.Nematol.12:226-227.
11. Kerry, B.R. 1987. Biological control. pp. 233-263. in: Principles and Practice of Nematode Control in Crops. Brown, R.H. and B.R. Kerry (eds), Acad. Press, Australia, pp 447.

12.Kerry, B.R. and D.H. Crump. 1977. Observations on fungal parasites of female and eggs of the cereal nematodes of *Heterodera avenae* and other cyst nematodes. Nematlogica 23:195-203.

13.Le, J.De.Fand B.R. Kerry. 1989. The potential of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent against root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). J. Nematol. 21(4):571(Abstr).

14.Mankau, R. 1975. *Bacillus penetrans* n.comb. causing a virulence disease of plant parasitic nematodes. J. Invert. Pathol. 26: 333-339.

15.Mankau, R. and M. McKenry. 1978. Spatial distribution of nematophagus fungi associated with *Meloidogyne incognita*. J. Nematol. 8(4):204 (abstr).

16.Mousa, E.M. 1991. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on tomato. J. Nematol. 23(4):542 (Abstr.).

17.Roberts, P.A.; I.J. Thomason and H. E. McKinney. 1981. Influence of non host, crucifers, and fungal parasites. J. Nematol.13 (2):164-171.

18.Rodriguez-Kabana, R. and G. Morgan-Jones. 1988. Potential of nematode control by mycofloras endemic in the tropics. J. Nematol. 20: 191-203.

19.Sayre, R.M. and M.P. Starr. 1985. *Pasteuria penetrans* (ex.Thorne 1940) nom. rev, comb, n.sp., a mycelial and endospore -forming bacterium parasitic in plant parasitic nematodes. Proc. Helminthol. Soc.Wash. 52:149-165.

20.Sikora, R.A. and B.R. Kerry. 1989. Formulation of fungal egg-parasites in alginate and their influence as a biological control of *Globodera pallida*. J. Nematol. 21(4):588(Abstr.).

21.Stirling G.R. and R. Mankau.1978. Parasitism of *Meloidogyne* eggs by a new fungal parasite. J. Nematol. 10:236-240.

22.Strling, G.R. and M.F. Wachtel. 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes *Meloidogyne*. Nematologica 26:308-312.

23.Thorne, G.1940. *Duboscqia penetrans* n.sp. (Sporozoa, Nosematidae) a parasite of nematode *Pratylenchus pratensis* (De Man) Filipjev. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 7: 51-53.

24.Westcott, S.W. and D.A. Kluepfel. 1992. Inhibition of *Criconemoides xenoplax* egg hatch by a strian of *Pseudomonas aureofaciens*. J. Nematol. 24 (4): 626. (Abstr.).