J. Agric. Sci. Mansoura Univ., 34 (3): 2309 - 2314, 2009

UTILIZATION OF *Trichoderma* SPP. IN BIOLOGICAL CONTROL FOR SOME ISOLATES OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI OF TOMATO AT AL-WASITAH DISTRICT.

Mohamed, Nawara A. and Nagwa A. Ibrahim
Plant Protection Dept., Omar Al-Mukhtar University, El-Bieda – Libya.

استعمال فطر الترايكودرما *Trihoderma* spp. فى المكافحة الحيوية لبعض الفطريات الممرضة لنباتات الطماطم فى منطقة الوسيطة فى ليبيا

نوارة على محمد و نجوى عبد الستار إبراهيم
قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة عمر المختار – البيضاء – ليبيا

الملخص

أظهرت عزلتى فطرى *T. harzianum*, *Trichoderma* spp. كفاءة عالية فى التضاد ضد الفطريات الممرضة *Pythium* spp., *Altrenaria solani*, *Fusarium oxysporum* التى عزلت من نباتات الطماطم فى صوبات الوسيطة بمنطقة الجبل الأخضر، وفى معمل قسم الوقاية بكلية الزراعة – جامعة عمر المختار. تم تعريفها كمسببات مرضية للطماطم، وأجريت مكافحة تلك الفطريات على مستوى المعمل بواسطة هذين النوعين من الجنس *Trichoderma* ووصلت نسبة التضاد إلى أكثر من ٩٥% على أطباق بترى حيث ثبطت نموها الميسليومى، وتم ذلك بالفحص المجهرى لمعرفة ميكانيكية التفاعل بين الفطريات المضادة والممرضة والتى أعطت قدرة تضادية ملحوظة وجد تناقص لنمو الفطريات الممرضة بشكل كبير عندما نميت مع نوعى *Trichoderma* المختبرين.

المقدمة

إن استخدام فطر التضاد *Trichoderma harzianum* أصبح أكثر شيوعا فى السنوات الأخيرة وتم اختباره ضد الفطر *Fusarium solani* فى الصوبات الزجاجية الموجودة فى غرب تركيا (Haikal, 2007)، كما اختبر عدد من أنواع *Trichoderma* على ممرضات الجذور لنبات الخيار وهى: *Rhizctonia solani, Fusarium solani* فوجد أن جميع المعاملات مؤثرة وسببت تناقص فى شدة المرض(Yucel وآخرون 2000)، إن نسبة موت البادرات ومرض عفن الجذور انخفضت فى وجود الفطر المضاد *Trichoderma harzianum* ذلك لأن هذا الفطر مسئول على تثبيط الفطر الممرض *Pythium* spp. (Green و Jensen 1992)، وعند مقارنة معاملة جذور نباتات الخيار المعدلة وراثيا والمعاملة بالسلالة رقم 382 لفطر *Trichoderma harzianum* وبأخرى مزروعة فى أنواع مختلفة من التربة كانت النتائج معنوية فى إيقاف مرض عفن الفيتوفيثورا (Khan وآخرون 2004)، وفى تجارب أجريت على مرضى موت البادرات وعفن الجذور على نباتات الخيار فى البيوت الزجاجية بكندا المتسبب عن *Pythium aphanidermatum* باستخدام مركبات تجارية أساسها كائنات حية مثل السلالة T-22 لفطر Trichoderma harzianum والسلالة *Trichoderma virens* G1-21 أتضح حدوث انخفاض فى إصابة النباتات بشكل معنوى تحت ظروف المرض العالية (Punji و Yip 2003)، حيث استخدما هذين النوعين من الفطر ضد *Fusarium oxysporum* مما أدى ذلك إلى خفض معدلات الإصابة بالمرض وتناقص نسبة الموت للنباتات وكان توقف المرض معنوى (Rose وآخرون 2003)، (الشعبى ومطرود 2002). كما وجد أن له قدرة تضاد عالية ضد الفطريات الممرضة باستخدام التضاد المزدوج عند اختباره فى أطباق بترى حيث خفض النمو الميسليومى للفطريات *Alternaria alternate* (Roco و Perez 2001)، (Essalmani و Lahlou 2002)، *Alternaria tenuissima* (Shanmugapriya وآخرون 1998) *Alternaria brassicae* (Meena وآخرون 2004) *Alternaria linicola* (Mercer وآخرون 1992) *Alternaria solani* (Lorito وآخرون 1998).

المواد وطرق البحث

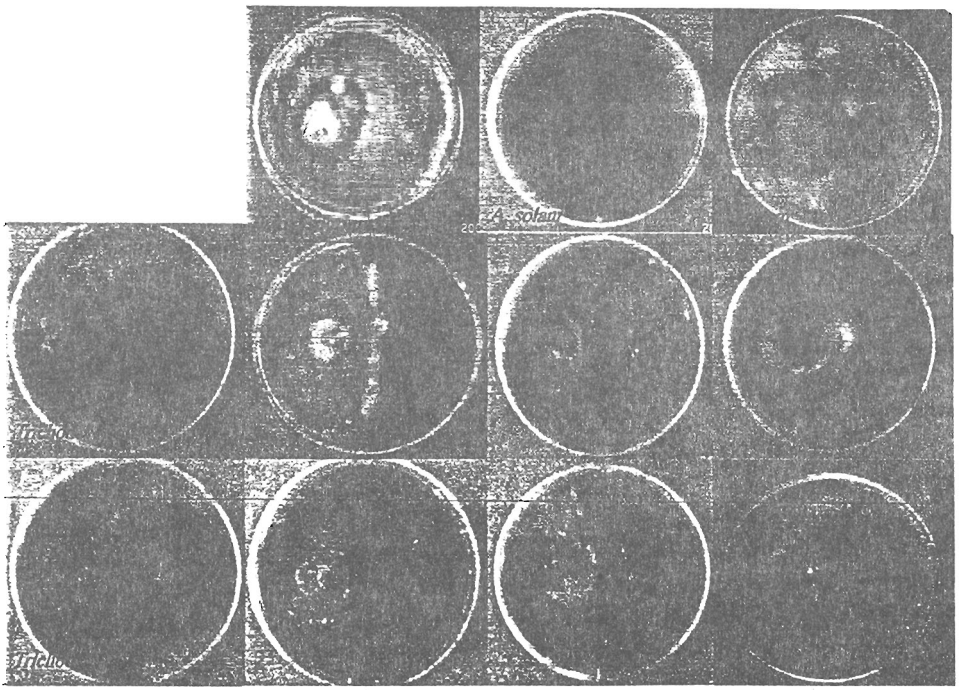
أختبر التضاد معملياً فى أطباق بترى قطرها 8.5 سم تحوى 15 مل من بيئة بطاطس دكستورز أجار (PDA) لبعض الفطريات الممرضة المتحصل عليها من عينات نبات الطماطم وهى *Fusarium oxysporum* المعزولة من شتلات ظهرت عليها أعراض الذبول، بواسطة الفطر *Alternaria solani* التى عزلت من الثمار المصابة بمرض اللفحة المبكرة، أما فطر *Pythium* sp. فتم عزله من بادرات ميتة وبين الفطريات المضادة وهى فطر *Trichoderma* sp. وكان رمزه (Tri 1) وفطر *Trichoderma harzianum* والتى أعطى له رمز (Tri 2) وذلك باستخدام قرص قطره 6 مم من نمو الفطر الممرض عمره 4 أيام على بعد 2.7 سم من حافة الطبق وعلى بعد 3 سم من ها القرص وضع قرص مماثل له فى المساحة والعمر من الفطر المضاد وفق طريقة Johnson وآخرون 1959 بمعدل 5 مكررات لكل معاملة وأعيدت التجربة مرتين متتاليين تحت نفس الظروف التجريبية بالإضافة للشاهد الكونترول (5 أطباق) كان فيها الفطر الممرض على حده، حضنت الأطباق على درجة حرارة 25 م° ± 1 فى الظلام، وتم حساب مساحة النمو (بواسطة متوسط أقطار مستعمرات النمو) لكل من فطر الشاهد أو للفطرين المضادين على نفس الطبق كل على حده بعد 3، 5، 7 أيام من التحضين وفق Mohamed 2007.

النتائج

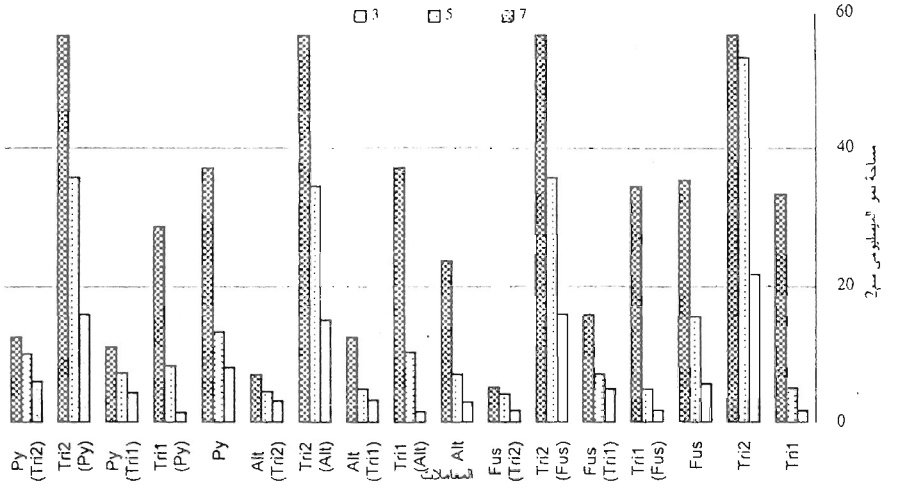
تشير النتائج إلى وجود التضاد بين الكائنات المضادة والكائنات الممرضة محل الاختبار عند تنميتها على بيئة البطاطس دكستروز أجار واتضح ذلك من قياس مساحة النمو الفطرى للفطريات جميعاً سواء أكانت نامية بمفردها كشاهد أو فى حالة تواجد الفطرين معاً فى نفس الطبق، كما أنه قد نمت جميع هذه الفطريات (ممرضة ومضادة) كل على حده على البيئة بشكل طبيعى مما يؤكد أن الوسط الغذائى المستخدم مناسب لهما كلها، وأن الفروق بين المعاملات المختلفة فى نتائج التحليل الإحصائى كانت معنوية، هذا وقد تم عمل التقييم النهائى للتجربة فى اليوم السابع لكل الأطباق وذلك عندما شغل نمو الفطر الممرض جميع سطح البيئة فى الطبق الشاهد. وقد لوحظ أنه عند المقارنة بين سرعة النمو الفطرى لكل الفطريات المختبرة نجد أنها تنمو بشكل طردى وتصل إلى أقصى نمو لها فى اليوم السابع، كما هو مبين بالشكل رقم (1) ويتضح من الشكل أن النمو غطى سطح البيئة ويظهر الفطريات تحتل الطبق بالكامل كما فى أطباق الشاهد وأن الفطريات الممرضة تناقص نموها بشكل ملحوظ فى الأطباق التى نميت معها الفطريات المضادة سواء *Trichoderma* sp. (Tri 1) أو فطر *Trichoderma harzianum* (Tri 2).

وتبين نتائج التحليل الإحصائى إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات المختلفة لكل من الفطرين المضادين ويتضح أن نمو الفطر *T. harzianum* (Tri 2) أسرع نموا على البيئة مقارنة بالفطر *Trichoderma* sp. (Tri 1).

ومن الشكل رقم (2) يتبين أن *T. harzianum* (Tri 2) قد غطى الطبق ووصل إلى ضعف نمو الشاهد لفطر *Trichoderma* sp. (Tri 1) وهو عالى التأثير على الفطريات الممرضة المختبرة عند المقارنة بأطباق الشاهد النامية عليها فى غياب الفطريات المضادة وأن قدرته التثبيطية كانت عالية حيث أصبح نمو *F. oxysporum* فى وجوده على نفس الطبق ضعيف جداً مقارنة بطبق الشاهد له، بينما كانت مساحة النمو لفطر *A. solani* أعلى بقليل مقارنة مع *F. oxysporum* ولكن كان أقل نمو للفطر *Pythium* sp. فى وجود هذا الفطر مما يدل على أنه فطر مضاد قوى لأن له القدرة على استعمار الطبق مما يحد من مساحة نمو الفطريات الأخرى نتيجة التثبيط بالتلامس (overgrowth)، ومن الشكل (1) يتضح أيضاً إن نمو *F. oxysporum* زاد بسرعة مطردة خلال الأيام الأولى (3، 5) التى أخذت بها القراءات فى وجود الفطر *Trichoderma* sp. (Tri 1) ثم أصبح النمو محدود مقارنة بالشاهد عند اليوم السابع، بينما وصل نمو الفطر *Trichoderma* sp. (Tri 1) الذى يشاركه الطبق إلى ضعف نمو *F. oxysporum*. كذلك كان نمو *A. solani* خاصة فى قراءات اليوم السابع. ويلاحظ أيضاً أن نمو *Trichoderma* sp. (Tri 1) فى وجود *A. solani* كان أعلى من نموه وهو بمفرده، بينما كان الفطر *Pythium* sp. ينمو بمعدل أسرع فى أطباق الشاهد ولكن تراجع هذا النمو بشكل معنوى فى وجود الفطر *Trichoderma* sp. (Tri 1).



شكل (1) يبين الفطريات الممرضة والفطريات المضادة النامية على أطباق بترى بها بطاطس دكستورز أجار .



شكل (2) يبين مساحة النمو الميسليومى بالسم^2 للفطريات المختبرة (الفطريات المضادة والفطريات الممرضة) النامية على بيئة بطاطس دكستروز أجار فى أطباق بترى . (إن قراءات الثلاثة فى كل معاملة تمثل مساحة نمو الفطر فى وجود الفطر الآخر الموضح بين القوسين) .

ومن الشكل (2) نجد فى أطباق الشاهد أن مساحة نمو *T. harzianum* (Tri 2) وصلت إلى 60 سم^2 ضعف مساحة نمو الفطريات *F. oxysporum* و*Pythium* sp.، بينما لم يتجاوز مساحة نمو *A. solani* حوالى ثلث نمو *T. harzianum* (Tri 2) الذى احتل جميع الأطباق التى يتقاسمها مع الفطريات الممرضة وأن الانخفاض غير ملحوظ خاصة فى القراءة الأخيرة لليوم السابع، بينما نجد أن نمو *F. oxysporum* و*A. solani* كان ضعيف جداً فى وجود *T. harzianum* (Tri 2) واستطاع الفطر *Pythium* sp. أن يأخذ مساحة أعلى منهما فى وجوده.

وبالفحص المجهرى نلاحظ ان مسيليوم الفطريات الممرضة المختبرة فى وجود أو غياب الفطريات المضادة لم يتأثر وإنها كانت طبيعية وأنه ليس لهذه الفطريات تأثير إنزيمى أو افتراسى وترجع مقدرتها التثبيطية إلى قدرتها العالية على استعمار البيئة وأن التطور الميسليومى للفطريات الثلاثة انخفض بشكل واضح نتيجة التثبيط بالتلامس وعدم وجود مسافة بين الفطريات الثلاثة ونوعى *Trichoderma* المختبرين.

المناقشة

تؤكد نتائج هذه الدراسة على أن الفطرين المختبرين التابعين لجنس *Trichoderma* لهما القدرة التثبيطية على الفطريات *Fusarium* و*Pythium* (Haikal 2007)، ويمكن استخدامها كمضادات فطرية لمقدرتها التثبيطية تحت الظروف المعملية (Rose وآخرون 2003)، وان هذه الفطريات لها القدرة على التثبيط بالتلامس عند إجراء التضاد المزدوج بينها وبين الفطريات الممرضة حيث نتج عنها انخفاض فى النمو الميسليوم لفطر *F. oxysporium* (Yucel وآخرون 2000) (Rose وآخرون 2003)، كما إنها ثبطت نمو *Pythium* sp. (Green و Jensen 1992) (Khan وآخرون 2004). وسجلت النتائج أيضاً انخفاض نمو الفطريات الممرضة بشكل ملموس وأن لها تأثير قوى (Punji و Yip 2003) على ميكانيكية التضاد، يرجع ذلك إلى أن فطر التضاد *Trichoderma* ثبط الفطريات الممرضة بواسطة الإنزيمات المحللة لجدارها الخلوى مثل Chitinases، B-1,3-glucanases، Proteases(Limon وآخرين 1999). وPolygalacturonase وهى ضرورية للحد من النمو الميسليومى للممرضات الفطرية لذا هى أكثر فعالية وغير متخصصة عليها (Fenghour وآخرين 2002).

المراجع

الشعبى، ص. ومطرود، ل. (2002). دراسة مختبرية لتقويم فاعلية عزلات مختلفة من أنواع فطور الترايكوديرما تجاه بعض الفطور الممرضة المنقولة بالتربة. مجلة وقاية النبات العربية. 20: 77 – 83.

Essalmani, H. and Lahlou, H. (2002). Etude *in vitro* de l'activté antagoniste de quelques microorganisms á l'encontre de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lentis.* Mycologie, 23: 221 – 234.

Fenghour, H. Ladjama, and A. Taibi, Z. (2002). Recherche de l'activité pectinolytiaue chez 22 souches de cha; pignons microscopiques isolees d'un sol de la region d'El Kala. Technologies Avancées 14:

Green, H. and Jensen, D.F. (1992). Population studies of *Trichoderma harzianum* and *Pythium* spp. And biological control of damping-off and root-rot of cucumber in peat following substrate amendment with oatmeal. Bulletin OILB/SROP. 15: 1, 42 – 44.

Haikal, N.Z. (2007). Improving biological control of *Fusarium* root-rot in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by allelopathic plant extracts. International Journal of Agriculture and Biology. Friends Science Publishers, Faisalabad, Pakistan. 9: 3, 459 – 461.

Johnson, L.F.; Curl, E.A.; Bond, J.H. and Fribourg, H.A. (1959). Methods studing soil microflora. Plant Diseases relationship. Minneapolis, Burgess Publication Company.

Khan, J.A.; Ooka, J.J.B.; Miller, S.A.C.; Madden, L.V.C. and Hoitink, H.A.J. (2004). Systemic resistance induced by *Trichoderma hamatum* 382 in cucumber against *Phytophthora* crown rot and leaf blight. Plant Diseases, 88(3), pp. 280 – 286.

Limon, M.C.; Pinto-Toro, J.A. and Benftez, T. (1999). Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa Chitinase. Phytopathology. 89: 254 – 261.

Lorito, M.; Woo, S.L.; Garcfa, I.; Colucci, G.; Harman, G.E.; Pintor-Toro, J.A.; Filippone, E., Muccifora, S.; Lawrence, C.B.; Zoina, A.; Tuzun, S. and Scala, F. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 7860 – 7865.

Meena, P.D.; Meena, R.L.; Chattopadhyaya, C. and Kumar, A. (2004). Identification of critical stage for disease development and biocontrol of Alternaria blight of Indian mustard (*Brassica juncea*). J. Phytopathology. 152: 204 – 209.

Mercer, P.C.; Ruddck, A. and Mcgimpsey, H.C. (1992). Evaluation of iprodione and Trichoderma viride against Alternaria linicola. Annals of applied biology. 120: 20 – 21.

Mohamed, N. (2007). Pythium et Pythiun: Rôle dans les relation vigne/Botrytis Cinerea. Ph.D. Thesis of Biochemic, Biologie Cellulaire et Moleculare. Ecole Doctorale des Sciences de la vie et de la sante Bourgogne University France.

Punja, Z.K. and Yip, R. (2003). Biological control of damping-off and root-rot caused by *Pythium aphanidermatum* on greenhouse cucumbers. Canadian Journal of Plant Pathology, 25(4), pp. 411 – 417.

Roco, A. and Pérez, L.M. (2001). *In vitro* biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaraia alternate* in the presence of growth regulators. Electronic Journal of Biotechnology. 4: 1 – 6.

Rose, S.; Parker, M. and Punja, Z.K. (2003). Efficacy of Biological and Chemical Treatments for Control of *Fusarium* Root and Stem Rot on Greenhouse Cucumber. Plant Disease, 87(12), pp. 1462 – 1470.

Shanmugapriya, M.; Malarivizhi, V.; Anitha, R. and Murugesan, K. (1998). Scanning electron microscopy of interaction between *Trichoderma longibrachiatum* and *Alternaria tenuissima*. Indian Journal of Microbiology 38: 45 – 47.

Yucel, S.; Pala, H.; Cali, S., and Erkilic, A. (2000). Combination of *Trichoderma* spp. And soil solarization to control root-rot diseases of cucumber in greenhouses conditions. Bulletin OILB/SROP. International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants (OIBC/OILB), West Palaearctic Regional Section (WPRS/SRO), Dijon, France. 23: 1, 77 – 81.

UTILIZATION OF *Trichoderma* SPP. IN BIOLOGICAL CONTROL FOR SOME ISOLATES OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI OF TOMATO AT AL-WASITAH DISTRICT.

Mohamed, Nawara A. and Nagwa A. Ibrahim
Plant Protection Dept., Omar Al-Mukhtar University, El-Bieda – Libya.

ABSTRACT

In this study two isolates of (*Trichoderma* spp. And *T. harzianum*) showed a high antagonistic effect against growth of the pathogenic fungi *Fusarium oxsporum, Altrenaria solani* and *Pythium* spp. which were isolated from diseased tomato plants grown in green houses at Al-Wasitah and identified in Plant Protection Lab. As causal disease on this plant.

The percentage of antagonism reached 95% on Petri dishes, by *Trichoderma* isolates which inhibited relatively the three mentioned pathogenic fungi.