المكافحة البيولوجية لمرض الذبول الفيوزاريومي في أشجار الزيتون المتسبب عن فطر *Fusarium solani*

فاتح عمر عجاج زيدان[1]، عيسى خليفة أحمودة[2]
[1] قسم وقاية النبات، كلية الزارعة، جامعة بني وليد، ليبيا.
[2]المعهد العالي للتقنيات الزراعية الخضراء، ترهونة، ليبيا.
zidan49104@yahoo.com.

الملخص:

أظهرت النتائج كفاءة عالية لعامل المقاومة البيولوجية لفطر *T. longibrachiatum* في تثبيط فطر *Fusarium solani* المسبب لمرض الذبول وتعفن الجذور لأشجار الزيتون حيث بلغت نسبة التثبيط 2 بمقياس Bell وحقق سيطرة واضحة على نمو الفطر الممرض بتثبيط نمو الخيوط الفطرية الهوائية على الوسط الزراعي PSA. كما أتضح أن الفطر الترايكوديرما له المقدرة على التطفل المباشر وظهر ذلك تحت المجهر الضوئي حيث كان هنالك التفاف خيوط الترايكوديرما المكافح حول خيوط الفطر الممرض مع تشوه في الشكل الخارجي. كما أظهرت الأبواغ الكونيدية الكبيرة Macroconidia تحولها من الشكل الهلالي إلى الشكل المستقيم وحدوث التغليظ في الحواجز العرضية وانفصال الخلايا عن بعضها. كما أوضحت نتائج التحليل الإحصائي أن إضافة لقاح عامل المقاومة الأحيائية *T. longibrachiatum* 1% إلى تربة ملوثة صناعياً بالمسبب المرضي *Fusarium solani* لأشجار الزيتون بنفس النسبة أدى إلى اختزال نسبة إصابة شتلات الزيتون صنفي الشملالي وكرواتينا فشدة المرض بلغت 16.66 و19.52% وبلغت نسبة الإصابة 24.57 و27.59% على التوالي لشتلات الزيتون، مقارنة شدة المرض بلغت 63.33 و67.43% وبلغت نسبة الإصابة 72.67 و 81.71% في التربة الملوثة بالفطر الممرض فقط . لم تكن هنالك أي فروقات معنوية بين أصناف الزيتون، وحدوث تقرح قواعد السوق وتعفن الجذور وذبول سريع مما أدى إلى موت الشتلات صنفي الشملالي وكرواتينا المصابة.

الكلمات المفتاحية: *المقاومة الأحيائية، الزيتون، تعفن الجذور، فطريات، Fusarium solani، T. longibrachiatum*

المقدمة:

يعد مرض الذبول الفيوزاريومي على أشجار الزيتون من بين الفطريات القاطنة في التربة والمتسبب عن الفطر *Fusarium saloni*، والطور الجنسي يسمى *Necteria haematococca*، الذي يتبع شعبة الفطريات الأسكية Ascomycota، (D.Barreto, *et. al*, 2003, Munjal, *et .al*, 2008). من أهم وأخطر الأمراض التي تهدد زراعة الزيتون بليبيا (العربي، وآخرون، 2009؛ زيدان، وآخرون، 2017، 2013). وسجل الفطر *Fusarium oxysporium* المسبب مرض الذبول بصوبات إكثار الزيتون بالعقل المجذرة في شمال غرب ليبيا وكانت نسبة الإصابة بمرض الذبول الفيوزاريومي أعلى من نسبة الإصابة بفطر الذبول الفرتسيليومي (البي، وآخرون، 2011). مرض الذبول الفيوزاريومي مرض عالمي الانتشار في معظم مناطق زراعة أشجار الزيتون (Barreto, *et, al*, 2003, Munjal, *et. al*, Sanei and Razari, 2012) وخصوصاً في الدول المطلة على حوض البحر الأبيض

المتوسط، المغرب (Chliyeh, *et. al*, 2014)، تونس (Hamid, *et. al*, 2011)، إسبانيا (Hernández, *et. al*, 1998)، مصر (Mousa, *et. al*, 2006)، إيطاليا (Vetraino, *et. al*, 2009). تتصف أعراض الإصابة بمرض الذبول الفيوزاريومي على أشجار الزيتون باصفرار الأوراق وتقرح قواعد السوق وتتعفن الجذور ويعقب ذلك ذبول سريع مما يؤدي إلى موت الشتلات والأشجار المصابة (Hamid, *et. al*, 2011, Hernández, *et. al*, 1998, Vettraino, *et. al*, 2009). ونتيجة للأضرار الكبيرة التي يحدثها فطر الذبول الفيوزاريومي على أشجار الزيتون ولما يتميز به الفطر من تحمله للظروف البيئية القاسية، والمدى العائلي الواسع، وإفرازه إنزيمات ومواد سامة مثل حمض الفيوزاريومي، إضافة إلى النمو السريع للفطر ويستطيع أيضاً إنتاج أعداد كبيرة من الأبواغ الفعالة في إحداث الإصابة وخصوصاً الأبواغ الكلاميدية التي تبقى حية في تربة الحقل مترممة إلى الأبد تقريباً وهذا يجعل المقاومة عن طريق الدورة الزراعية أو العمليات الزراعية الأخرى غير العملية (Agrios, 1997).

تعتبر شجرة الزيتون شجرة مقدسة ورد ذكرها في القرآن الكريم، قال تعالى: (والتين والزيتون وطور سنين وهذا البلد الأمين). ونظراً لزيادة اهتمام الفلاحين بزراعة شجرة الزيتون (*Olea europaea* L.)، وتزايد الطلب على الزيت ومخزون الزيتون على مستوى الأسواق العالمية والمحلية، نتيجة البحوث التي أبرزت القيمة الغذائية لهذه المنتجات وأدوارها الهامة في الوقاية من بعض الأمراض. وبالنظر لتزايد خطورة هذا المرض على أشجار الزيتون ولندرة البحوث المتعلقة بمكافحته على أشجار الزيتون، ولما أشارت إليه الدراسات عن جنس *Trichoderma* spp. من فعالية عالية كعامل مكافحة أحيائية للعديد من المسببات المرضية وخصوصاً فطريات التربة بسبب امتلاك الفطر للعديد من الآليات التي تؤثر من خلالها في الفطر الممرض كالتطفل على الطفيليات الممرضة وإفراز إنزيمات وإنتاج المضادات الحيوية ذات تأثير تضادي والتنافس الشديد في محيط الجذور على المكان والغذاء، وتحسين نمو النبات (الشعبي ولينا، 2002، الصايغ، 2017؛ Akrame, 2015) بالإضافة لسهولة عزله وسرعة إكثاره وإنتاجه العالي من الأبواغ وتحمله للظروف البيئية غير الملائمة ولا يحتاج إلى متطلبات غذائية (Bokhari and Kahkashan, 2012, Sallam, 2008). أتجهه التفكير لهذه الدراسة بغية تقييم فعالية الفطر *Trichoderma* ضد مرض ذبول الفيوزاريومي لأشجار الزيتون، ويمكن أن يشكل مصدر بديل عن المبيدات الفطرية التي أصبحت مشكله رئيسية من مشاكل التلوث البيئي والصحي وصعوبة السيطرة على أمراض الذبول باستخدام المبيدات الكيميائية.

المواد وطرائق العمل:

أ- **العزل وتعريف فطر *Fusarium solani*:** ثم عزل الفطر الممرض من جذور شتلات الزيتون ظهرت عليها أمراض الذبول الفيوزاريومي من بستان بوادي حلبوص بني وليد – ليبيا) للموسم الزراعي خريف 2015، سبق أن سجلت فيه إصابة بمرض الذبول الفيوزاريومي من قبل الباحثين (5)، مزروعة بشتلات زيتون، وذلك بقلع الشتلات باحتراس شديد ووضعها في أكياس بولي اثيلين ونقلت إلى مختبر أمراض النبات، غسلت الجذور تحت ماء جارٍ حتى تمت إزالة الأتربة العالقة بها، ثم قطعت بواسطة مشرط معقم إلى إجزاء صغيرة بطول 3 – 5 ملم من كل من نهايات الجذور، عقمت سطحياً بمحلول هيبوكلورايد الصوديوم (NaOCl)1% من المحلول التجاري لمدة دقيقتين، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم مرتين لإزالة آثار المادة السامة منها، وتم نقلها بواسطة ملقط معقم إلى أطباق بتري تحوي على وسط غذائي من مستخلص البطاطا والسكروز والآجار Potato Sucrose Agar (PSA) المعقم(400 غم بطاطا، 20غم سكروز، 20غم آجار، 1000 مل ماء مقطر) والمضاف إليه المضاد الحيوي كلورامفينيكول

Chloramphenicol بمعدل 0.5 ملغم/لتر، لمنع نمو المستعمرات البكتيرية، زرعت الأجزاء النباتية وبواقع أربعة قطع لكل طبق وبثلاثة مكررات لكل جزء وحضنت عند درجة حرارة 25± 2 مْ لمدة 3 -7 أيام، وشخص الفطر لغرض استخدامه في التجارب اللاحقة إلى مستوى النوع على أساس الخصائص المورفولوجية للمستعمرات الفطرية استناداً على الصفات العلمية الخاصة بتصنيف وتقسيم (Barnes, and Sumerell and Leslie, 2002) Hunter, 1972:

ب- حفظ عزلات الفطر Fusarium solani: حملت عزلات الفطر *Fusarium* المعزولة من الأشجار على بذور الدخن *Panicum* spp. وغسلت البذور بشكل جيد لإزالة الأتربة والشوائب عنها ثم نقعت لمدة 6 ساعات بعدها وضعت على ورق نشاف لامتصاص الماء الزائد ووضعت في أنابيب زجاجية ذات غطاء معدني محكم الأغلاق ووضعت في كل انبوبة 50غم من البذور وعقمت بجهاز التعقيم البخاري على درجة الحرارة (121 مْ وضغط 1.5 كغم/سم2) لمدة 20 دقيقة. وتركت لمدة يوم واحد وعقمت بجهاز التعقيم البخاري وتحت الظروف القياسية. لقحت البذور بعزلات الفطر لكل أنبوبة على حدة وذلك بوضع قرص بقطر 0.5 سم بواسطة ثاقب فليني لكل أنبوبة من الفطر النامي على الوسط الغذائي P.S.A. بعمر سبعة أيام وتم غلق الأنابيب بأحكام ووضعت بالحاضنة لمدة عشرة أيام بدرجة حرارة 25 ± 2 مْ، مع الرج لضمان توزيع الفطر على جميع البذور، بعدها تركت بدرجة حرارة المختبر لاستعمالها وقت الحاجة.

جـ- فطر المقاومة الأحيائية *Trichoderma longibrachiatum*: عزلة محلية مجربة على بعض ممرضات النخيل والزيتون وبعض الفطريات الأخرى تم تعريفها في بريطانيا إلى مستوى النوع وقد أعطي لها الرمز (TNG2) تم الحصول عليها من قبل الدكتورة نجاة خليفة الغرياني، قسم وقاية النبات/كلية الزراعة/جامعة طرابلس- ليبيا. وتم إكثار الفطر وحفظت العزلة منه في الثلاجة على درجة حرارة 4 °م لحين استعمالها في التجارب اللاحقة.

آليات تأثير فطر المقاومة الأحيائية في الفطر الممرض معملياً:

اختبار تقانة الزرع المزدوج: أجريت التجربة لدراسة القدرة التضادية بين الفطر المعزول من جذور أشجار الزيتون *F. solani* مع فطر المقاومة الأحيائية *T. longibrachiatum* وباستخدام تقانة الزرع المزدوج في أطباق بتري، لقحت الفطريات على الوسط الغذائي PSA قطره 9 سم وقسم إلى قسمين متساويين من القطر الوسطي، لقح مركز النصف الأول بقرص 0.5 سم أخذ من مزرعة نقية للفطر *F. solani* كل على حدة بواسطة ثاقبة الفلين المعقم ولقح مركز النصف الثاني للطبق بقرص 0.5 سم أخذ من حافة مزرعة نقية للفطر المضاد *T. longibrachiatum*. تم تقيم ظاهرة التضاد حسب المقياس المكون من خمس درجات هي:

1- الفطر المضاد يغطي الطبق بكامله.
2- الفطر المضاد يغطي ثلثي مساحة الطبق.
3- الفطر المضاد والفطر الممرض يغطي لكل منهما نصف مساحة الطبق.
4- الفطر الممرض يغطي ثلثي من مساحة الطبق.
5- الفطر الممرض يغطي الطبق بكامله.

ويعد الفطر مضاداً حيوياً اذا كان المقياس (2) فأقل.

أخذت مسحة فطرية من منطقة التداخل بين فطر التضاد الترايكوديرما مع الفطر الممرض الفيوزاريومي وتمت فحصها مجهرياً ومقارنتها مع الشاهد وذلك لملاحظة ومتابعة تأثير فطر التضاد على الغزل والأبواغ للفطر الممرض، استعملت ثلاثة مكررات لكل من معاملة التضاد ومعاملة الشاهد.

تأثير عامل المكافحة الأحيائية في حيوية الفطر الممرض الفيوزاريومي:

نتيجة عدم تكون هالة فاصلة بين نمو فطر عامل المكافحة الحيوية الترايكوديرما والفطر الممرض الفيوزاريومي في الزرع المزدوج، ونمو الفطر التضاد فوق الفطر الممرض، وبهدف معرفة إمكانية تطفل فطر المكافحة على الفطر الممرض، أجريت التجربة المختبرية وذلك بأخذ قرص 5ملم من نمو مستعمرة فطر *T. longibrachiatum* بعد 7، 10، 13 يوم من بداية الزرع المزدوج وأخذ القرص من المنطقة القريبة من التماس بواسطة ثاقب فليني معقم وزرع على المستنبت الغذائي PSA وحضنت الأطباق (9سم) على درجة حرارة 25 ± 2 °م، لمدة سبعة أيام، أما معاملة المقارنة أخذت أقرص من مزرعة نقية لفطر التضاد *F. solani* ، وأعيد زراعتها على المستنبت الزراعي بعد تعقيمها بطريقة نفسها، وحصنت لنفس الفترة أعلاه، وفحصت بعد انتهاء فترة التحضين لمعرفة تأثير فطر التضاد على نمو الفطر الممرض وفي حالة فشل النمو في الأقراص المأخوذة من أطباق المزرعة المزدوجة فهذا دليل على موت الفطر الممرض.

تقييم كفاءة عامل المكافحة الأحيائية الترايكوديرما ضد فطر الذبول الفيوزاريومي على شتلات الزيتون:

1- تحضير لقاح الفطريات:

أجريت هذه التجربة بتنمية الفطر المقاومة الأحيائية *Trichoderma*، وفطر الذبول *Fusarium solani* على بذور الدخن *Panicum* spp (50غم بذور الدخن، 50 مل ماء مقطر) بعد أن عقمت بجهاز التعقيم (121 مْ وضغط 1.5كغم/سم2) لمدة 15 دقيقة. أعيد التعقيم في اليوم التالي. وبعد تبريدها لقحت الدوارق سعة 250سم2 المحتوية على الوسط بواسطة الثاقب الفليني بخمسة أقراص قطر 5 ملم من مستعمرة الفطريات النامية على الوسط الغذائي PSA بعمر سبعة أيام كل على انفراد، وحضنت تحت درجة حرارة 27 ْم لمدة 10 أيام مع رج الدوارق كل 48 ساعة يدوياً لضمان التهوية وتوزيع نموات الفطر على جميع البذور.

2- تلويث تربة شتلات الزيتون باللقاح:

نفذت هذه التجربة باستجلاب شتلات الزيتون صنفي الشملالي وكرواتينا من المشتل الزراعي بني وليد عمرها سنتين بعد التأكد من خلوها من الأمراض. تمت معاملة التربة بالفطريات وذلك بنسبة 1غم/كغم تربة، حيث خلطت الكتل الحيوية التي نميت على بذور الدخن المحلي ووزعت في الأكياس الزراعية لشتلات الزيتون، بحسب توزيع المعاملات الأتية.1- خلط لقاح الفطر الذبول ولقاح المقاومة الأحيائية في آن واحد وبنسبة 1% وزن/ وزن. 2- أضيفت بذور دخن معقمه وخالية من أي فطر إلى معاملة المقارنة. 3- إضافة فطر الذبول فقط إلى التربة. ووضعت الشتلات في غرفة النمو على درجة حرارة من 25 – 30، وبواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة، واستمرت الملاحظات اليومية للشتلات مع ريها كلما دعت الحاجة، تم إزالة الشتلات الذابلة والميتة وسجلت الأعراض التي ظهرت عليها، بعد ثلاثة شهور من بدء تنفيذ التجربة، وتم عزل وتشخيص فطر الذبول من شتلات الزيتون الملوثة

بالفطر للتأكد من أن الإصابة ناتجة عن الفطر المستعمل في الدراسة. تم تقدير النسبة المئوية للإصابة وشدة المرض على شتلات الزيتون. وحسبت النسبة المئوية للإصابة وفق المعادلة الآتية:

$$\% \text{ الإصابة} = \frac{\text{عدد الشتلات المصابة}}{\text{العدد الكلي للشتلات المفحوصة}} \times 100$$

أما شدة مرض ذبول الفيوزاريومي فقدرت بالعين المجردة وباستخدام الدليل المرضي المستخدم والمؤلف من الدرجات كما يأتي:

الدرجة	% للجزء المصاب من شتلات الزيتون	الدليل المرضي
	شتلات سليمة	0
1	25 - 1	1
2	50 - 26	2
3	75 - 51	3
4	100 - 76	4

كل رقم يمثل الجزء المصاب من شتلات الزيتون الأجزاء التي تظهر عليها أعراض اصفرار وذبول واستخدمت المعادلة التالية لحساب شدة المرض لكل مكرر وعلى النحو الآتي:

$$\% \text{ شدة الإصابة} = \frac{\text{مجموع (عدد النباتات المصابة بكل درجة} \times \text{دليلها المرضي)}}{\text{عدد النباتات المفحوصة} \times \text{أعلى دليل مرضي}} \times 100$$

التحليل الإحصائي:

تم التحليل الإحصائي لتجارب المعملية وتقييم الفروق بين المتوسطات الحسابية على أساس اختبار دنكن لأقل فرق معنوي LSD عند مستوى احتمالية 5 %، صممت التجارب المختبرية حسب التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design.

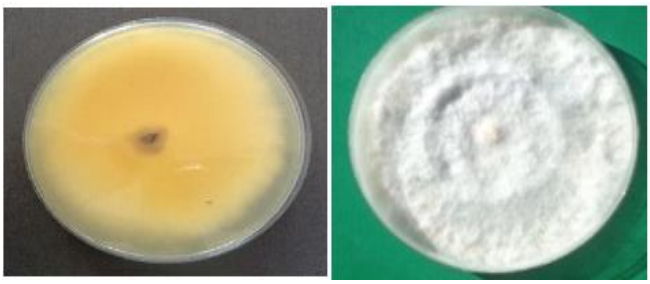
النتائج والمناقشة:

أعراض المرض على أشجار الزيتون: من خلال الزيارات الميدانية لبعض الأودية ببني وليد وهي (حرقوص، أمريش، غبين) (شكل.1). لوحظت بعض أشجار الزيتون تعاني من أعراض مرضية متمثلة في اصفرار الأوراق وذبول الأوراق ومع تقدم شدة الإصابة تتساقط الأوراق وجفاف نهايات الأفرع، كما لوحظ تلون بعض الأفرع الرئيسية بلون بني محمر، وتقرح منطقة الساق قرب السطح ويظهر في الأوعية الناقلة لجذور النباتات المصابة تلونها بلون البني المحمر وتعفن الجذور ويحدث تيبس كامل للأشجار المصابة وموتها وهذا ما تؤكده العديد من الدراسات (Maroua, *et. al*, 2017, Munjal and Thakur, 1982).

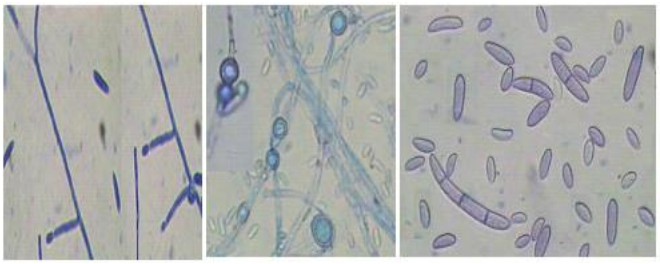
تشخيص الفطر *Fusarium solani*: أظهرت نتائج العزل على الوسط الزراعي ظهور نمو الخيوط الفطرية الهوائية بلون أبيض قطني على السطح العلوي للأطباق يلامس غطاء الطبق بعد سبعة أيام من إجراء التجربة على درجة حرارة 25 °م ± 2 بينما كان السطح السفلي لون كريمي لمزرعة الفطر كما هو موضح في (الشكل. 2). كما أظهر الفحص المجهري (شكل. 3) للمسبب المرضي وجود ثلاثة أنواع من الأبواغ، أبواغ كونيدية صغيرة (Microconidia) بيضاوية أو كلوية الشكل ذات خلية واحدة أو خليتين تنتج الأبواغ على حوامل مفردة

(Monophailides) طويلة. أما الأبواغ الكونيدية الكبيرة (Macroconidia) فكانت هلالية الشكل، الخلية القاعدية تكون قدمية أو أسطوانية أما الخلية القمية تكون غير حادة ومدوراه، مقسمة إلى 3 حواجز عرضية. أما الأبواغ الكلاميدية فلوحظت بشكل مفرد أو في سلسلة قصيرة طرفية أوبينية وأحياناً داخل الأبواغ الكونيدية الكبيرة. هذه الصفات تطابق الصفات المزرعية والمجهرية للفطر *Fusarium saloni* المسبب لمرض الذبول وعفن الجذور لأشجار الزيتون، وجاءت هذه النتيجة مشابهة لما وجده (Bokhari and Kahkashan, 2012, Hamid, *et. al*, 2011).

شكل (1) يوضح أعراض مرض الفطر *Fusarium solani* على أشجار الزيتون، (أ). أعراض الذبول، (ب). أعراض التقرح على الساق بالقرب من منطقة التاج (ج). احمرار الساق أعراض تساقط الأوراق وموت الشجرة.

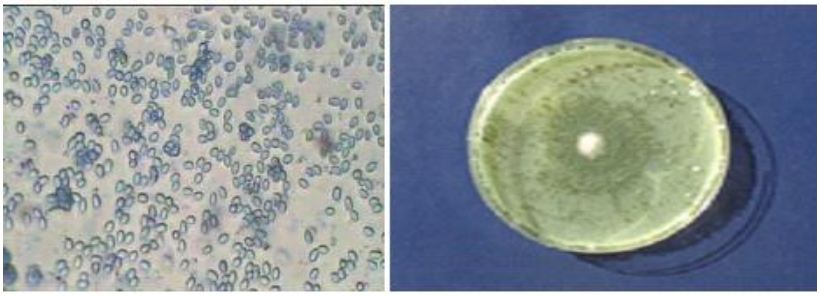


شكل (2) مستعمرة الفطر(يمين) الجهة العلوية نمو أبيض قطني، (يسار) الجهة السفلية لون كريمي للفطر *Fusarium solani*، المسبب مرض عفن الجذور لأشجار الزيتون.



شكل (3) الأبواغ الكونيدية الصغبرة Microconidia الأبواغ الكونيدية الكبيرة Macroconidia شفافة مقسمة (بها 3 حواجز). الأبواغ الكلاميدية، حوامل مفردة Monophailides طويلة، الطور اللاجنسي للفطر *Fusarium solani* المسبب لمرض الذبول على أشجار الزيتون، على التوالي، تحت قوة تكبير 100×.

عزل الفطر *T. longibractium*: أما مزرعة الفطر شكل (4) تميزت بنمو أبيض قطني ما لبت أن تحول إلى اللون الأخضر نتيجة تكون الأبواغ الكونيدية التي أعطت للمزرعة شكل المسحوق الأخضر.



شكل (4) مستعمرة الفطر *T. longibrachiatum*، (يمين) الجهة العلوية نمو أبيض يتحول إلى اللون الأخضر، (يسار) الأبواغ، تحت قوة تكبير 100×.

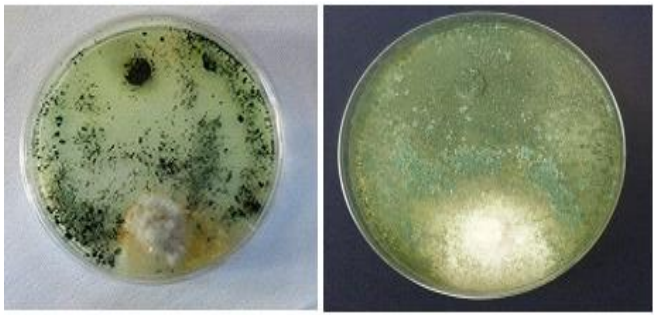
تحضير اللقاح الفطري: أوضحت نتائج تحضير اللقاح الفطري على بدور الدخن المعقمة (شكل. 5) تلونها باللون الأبيض التي تم تلقيحها بالفطر الممرض *Fusarium solani*، بينما أظهرت نتائج تحضير اللقاح للفطر *T. longibrachiatum*، على بدور الدخن المحلي المعقم تلون البذور باللون الأبيض ثم يتحول سريعاً إلى اللون الأخضر نتيجة نمو وتكون الأبواغ الكونيدية الخضراء للفطر.

شكل (5) تحضير اللقاح الفطري للفطر *F. solani*، فطر *T. longibrachiatum*، بذور الدخن بدون فطر على التوالي.

آليات اختبار المقاومة للفطر الترايكوديرما ضد الفطر الممرض:

1- **اختبار القدرة التضادية بين الفطرين معملياً:** أوضحت النتائج (الشكل.6) باستعمال تقانة الزرع المزدوج مقدرة الفطر الترايكوديرما في كبح نمو فطر تعفن الجذور الفيوزاريومي تحت ظروف المختبر عند درجة حرارة 25 ± 2°م، وذلك حسب سلم التقييس الخماسي حيث تميز فطر المكافحة الحيوية بسرعة نمو سريعة مقارنة مع الفطر الممرض، فكان في اليوم السابع من المواجهة يغطي ثلثي مساحة الطبق أي مقدرة تضادية عالي تمثلت بدرجة 2 بمعدل مقياس (Bell) بينما لم تحتل عزلة الفطر الممرض سوى مساحة الثلث من الطبق، كما لوحظ بعد أسبوعين من الزرع قد غزت عزلة فطر المكافحة الحيوية مستعمرة الفطر الممرض وتبوغت عليها ومنع نمو وانتشار ميسيليوم المُسبب المرضي، وأثبت الفحص المجهري أن هناك تلامس مباشر بين مستعمرات فطر المكافحة الحيوية الترايكوديرما

ومستعمرات الفطر الممرض الفيوزاريوم، تلاه نمو مستعمرة فطر المكافحة فوق سطوح مستعمرات الفطر الممرض والتفاف الخيوط الفطرية للمكافحة على خيوط الفطرية للمرض مما يدلل على مقدرة فطر المكافحة الحيوية العالية ضد الفطر كما تتفق هذه النتائج مع عدد من البحوث (Sianeto and Amugune, 2010, Suarez, et. al, 2008).



شكل (6) تقانة الزرع المزدوج لدراسة مقدرة الفطر الترايكوديرما *T. longibrachiatum* في كبح نمو فطر تعفن الجذور الفيوزاريومي *F. solani*. بعد أسبوع وبعد أسبوعين على التوالي من الزرع المزدوج.

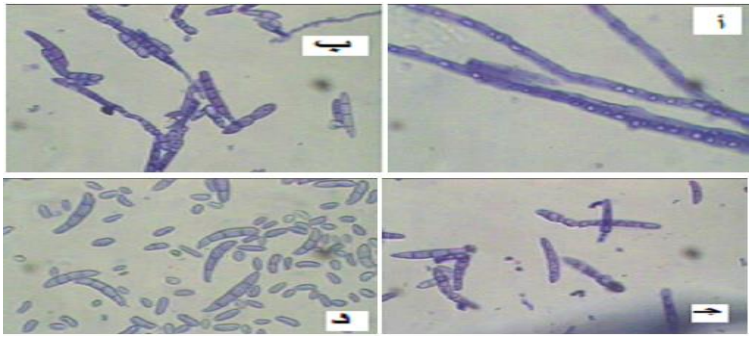
الفحص المجهري:

أوضحت الصور المجهرية كما في الشكل (7) لمنطقة التضاد بعد أسبوعين من الزرع المزدوج، التفاف خيوط عامل المكافحة الأحيائية الترايكوديرما على الغزل الفطري للممرض الفحص المجهري أن هناك تلامساً مباشراً بين مستعمرة المكافحة الحيوية ومستعمرات الفطر الممرض، تلاه نمو مستعمرة المقاوم الحيوي فوق سطح مستعمرات للفطر الممرض الفيوزاريومي والتفاف بعض خيوط الغزل الفطري للمقاوم الحيوي حول الغزل الفطري للفطر الممرض، كما لم يلاحظ في كافة المكررات للمعاملة من خلال الفحص المجهري ظهور مناطق فاصلة بين النمو للمستعمرة الفطرية لفطر التضاد الترايكوديرما مع النمو الفطري لمستعمرات الفطر الممرض الفيوزاريومي. تتحول الأبواغ الكونيدية الكبيرة Macroconidia المتكونة من ثلاثة خلايا من الشكل الهلالي إلى المستقيم وحدوث انفصال الخلايا للأبواغ عن بعضها البعض ولم تشاهد هذه الظاهرة عند تنمية فطر الفيوزاريومي على الوسط الغذائي بدون فطر الترايكوديرما، وقد يرجع التأثير التثبيطي إلى التأثير على مادة اللجنين وهذا ما توكده الدراسات (الصايغ، 2013). أن أمتلاك الفطر *Trichoderma* spp لهذه الخاصية قد يعود لعدة أسباب جعلت من هذا الفطر عامل مكافحة أحيائية ضد العديد من الفطريات الممرضة للنبات ومن ضمنها *F. solani* ومن هذه الأسباب التطفل المباشر على الغزل الفطري للممرض عن طريق الالتفاف حول خيوطه وتحليل جدرانه بواسطة الإنزيمات التي يفرزها وإنتاج المضادات الحيوية والتي تؤثر بشكل سلبي على نمو الفطر الممرض كما تؤكد العديد من الدراسات (Harman, et. al, 2004, Vinale, et. al, 2014).

تأثير عامل المكافحة الأحيائية في حيوية الفطر الممرض الفيوزاريومي:

أوضحت نتائج التجربة الموضحة في الجدول.1 بأن عامل المكافحة الحيوية الترايكوديرما له تأثير على حيوية الفطر الممرض الفيوزاريومي وثبط نموه حيث بلغ معدل النمو 1.03 سم بفرق عالي المعنوية عن معاملة المقارنة التي بلغ

معدل النمو فيها 9 سم مما يفسر بأن عامل المكافحة الحيوية الترايكوديرما يحصل على غذائه بواسطة إرسال تراكيب خاصة يتغلغل من خلالها داخل خلايا الفطر الممرض ويمتص المواد الغذائية منها مباشرة وتوافقت هذه النتائج مع ما نشر في دراسات سابقة عند استخدام فطر المكافحة الترايكوديرما ضد فطر الذبول الفيوزاريومي.



شكل (7) صور مجهرية، النشاط التضادي لعامل المكافحة الأحيائية *Trichoderma* ضد الفطر *Fusarium solani* المُسبب مرض الذبول الزيتون. (أ) تشوه في الشكل الخارجي وتحبب للخيوط الفطرية الهوائية. (ب، جـ) تحول الأبواغ الكونيدية الكبيرة من الشكل الهلالي إلى الشكل المستقيم وحدوث انفصال الخلايا للأبواغ. (د) فطر الفيوزاريومي على الوسط الغذائي بدون فطر الترايكوديرما، تحت قوة تكبير 100×.

جدول 1: تأثيرعامل المكافحة الأحيائية في حيوية الفطر الممرض *F. solani*.

فطر المكافحة	عمر المزرعة الغذائية (الأيام)	*معدل النمو القطري للفطر الممرض (سم)
T. longibrachiatum	4	1.76
	7	1.33
	13	0.00
المعدل		1.03

* كل رقم يمثل معدل النمو الفطري لعزلة الفطر المكافح في 6 أطباق بتري.

تقييم كفاءة عامل المكافحة الأحيائية الترايكوديرما ضد فطر الذبول الفيوزاريومي على شتلات الزيتون:

من خلال النتائج المتحصل عليها جدول (2) أن معاملة عامل المكافحة الأحيائية مع فطر التعفن الجذور الفيوزاريومي خفضت بشكل معنوي شدة المرض ونسبة الإصابة بالفطر المسبب مرض تعفن الجذور لشتلات الزيتون الراسلي وكروانتينا فكانت شدة المرض 16.66 و19.52% وبلغت نسبة الإصابة 24.57 و 27.59% على التوالي لشتلات الزيتون وبالمقارنة مع معاملة الشاهد (فطر تعفن الجذور فقط إلى تربة شتلات الزيتون) مما يدلل على انخفاض شراسة الفطر الممرض نتيجة إضافة فطر المكافحة الأحيائية وبشكل معنوي كما لم تظهر فروق معنوية بين معاملة (فطر المكافحة الأحيائية مع فطر التعفن الجذور) ومعاملة (بذور دخن معقمه وخالية من أي فطر)، بينما عند إضافة فطر تعفن الجذور *F. solani*. إلى شتلات الزيتون ارتفعت شدة الإصابة على شتلات الزيتون بالمقارنة مع المعاملة (بذور دخن معقمه وخالية من أي فطر) حيث سجلت أعلى شدة ونسبة إصابة لشتلات الزيتون صنفي الراسلي وكروانتينا المعاملة بالفطر الممرض فقط حيث بلغت شدة المرض 63.33 و67.43% وبلغت نسبة الإصابة

72.67 و81.71% على التوالي مقارنة بعدم وجود إصابة في معاملة الشاهد، وبعد أسبوع من عملية العدوى بالفطر الممرض للشتلات ظهر على بعض الأوراق نمو أبيض زغبي على السطح العلوي للأوراق مبينة في الشكل (8)، كما ظهرت بعد شهر من المعاملة التربة بالفطر الممرض على الشتلات الشكل (9) أعراض التقرحات بالقرب من منطقة التاج وبعد 90 يوم من إجراء عملية حقن التربة بالفطر الممرض ظهرت أعراض الذبول على الأوراق والتفافها إلى الداخل مما أدى إلى موت الشتلات وذلك لنمو الفطر الممرض خلال لحاء جذر النبات باتجاه الأوعية الناقلة، ويستقر في الأوعية الخشبية للنبات مما يودي إلى انسدادها أو تخريب جدرها، وإفرازه انزيمات المحللة للسيللوز والبكتين المحطمة لجدران الخلايا ومواد سامة مثل حمض الفيوزاريك (الذي يؤدي إلى تعطيل امتصاص الماء والعصارة الغذائية مما يخفض صعود الماء في السوق والأوراق وبالتالي تجف الأفرع ويحدث الذبول الكامل للأشجار المصابة بالفطر الممرض، وعند إزالة الشتلات لوحظت أعراض التعفن على الجذور كما يؤكده المرجع العلمي (Agrios, 1997).

جدول 2: تأثير عامل المكافحة الحيوية الترايكوديرما في فطر الفيوزاريومي المسبب مرض الذبول لأشجار الزيتون.

المعاملات	% لشدة المرض		% للإصابة	
	الشملالي	كرواتينا	الشملالي	كرواتينا
Fusarium solani	63.33	67.43	72.67	81.71
F. solani + *T. Longibrachiatum*	16.66	19.52	24.57	27.29
الشاهد	0	0	0	0
أقل فرق معنوي عند مستوى معنوية 0.05	13.42	9.67	16.29	11.69

كل رقم في الجدول يمثل ثلاثة مكررات.

%النسبة المئوية

الشكل (8) شتلات زيتون صنف الشملالي وكرواتينا أعراض أبيضاض على السطح العلوي لأوراق شتلات الزيتون بعد أسبوع من العدوي بالفطر *F. solani*. تقرح الساق بالقرب منطقة التاج. الذبول على الأوراق والتفافها إلى الداخل على شتلات الزيتون المعاملة بالفطر الممرض فقط.

الشكل (9) يوضح مختلف المعاملات لتأثير عامل المكافحة الأحيائية الترايكوديرما ضد فطر الذبول الفيوزاريومي على شتلات الزيتون صنفي الشملالي وكرواتينا.

إن هذه النتائج تؤكد مقدرة فطر *T. longibrachiatium* على مكافحة فطر الذبول وتعفن الجذور *F. solani* لأشجار الزيتون. كما تؤكد العديد من الدراسات مقدرة فطر الترايكوديرما على خفض تركيز السم فيوزاريك المفرز من الفطريات كما يعمل على تحفيز المقاومة الجهازية في النبات، وزيادة نمو النبات وربما يعزى ذلك إلى تطور نمو المجموع الجذري نتيجة زيادة محتوى الجذور النباتات بمادة Peroxidase مقارنة بجذور النباتات غير المعاملة، وزيادة جاهزية العناصر الغذائية في محيطها تتفق هذه الدراسة مع العديد من الدراسات (Masunaka and Takenaka, 2011, Tahia, *et. al*, 2004). كما يتبين التأثير المحفز للفطر *Trichoderma spp*. من قبل العديد من الباحثين (Summerell and Leslie, 2003) . يمكن أن يحفز نمو النبات ويمكن تفسير الأسباب التي أدت إلى نمو النبات عند المعاملة بفطر المكافحة الأحيائية قد يرجع إلى دور الفطر في تنشيط آليات النمو التي تسيطر عليها منظمات النمو المنتجة داخل النبات منها الأوكسين حامض أندول الأسيتك (IAA) فضلاً على قدرته على إنتاج الجبرلينات والتي لها أهمية كبيرة في تنظيم النمو كما أن للفطر القدرة على زيادة جاهزية الحديد من ثالث أوكسيد Fe الحديديك بتحويله إلى الحالة المخلبية واختزال أيون الحديديك إلى أيون الحديدوز الأكثر جاهزية، أما التأثير الإيجابي لحامض الأسكوربك قد يعود إلى دورة في زيادة تركيز النتروجين في الأوراق أو لدوره في زيادة تركيز الكلوروفيل من خلال توفير العناصر الغذائية الداخلة في تركيبه، وبسبب تمكنه من الاستقرار في جذور شتلات الزيتون مما يعمل على حمايتها عن طريق تقليل الإصابة بالفطر الممرض. أن نتائج هذا البحث تتفق مع العديد الباحثين الذين أشاروا (Aly, *et. al*, 2007, Suarez, et. al, 2008, Sunil, *et. al*, 2007) إلى أن عزلات الفطر الترايكوديرما قد أظهرت مقدرة عالية في مكافحة الفطر الفيوزاريومي المسبب مرض الذبول وتعفن الجذور مختبرياً وحقلياً في العديد من المحاصيل الزراعية.

المراجع:

البي، عمر عمران؛ العاقل، على أبو القاسم؛ والدنقلي، الزروق أحمد. (2011). مرض الذبول بصوبات إكثار الزيتون (*Olea europaea* L.) بالعقل المجذرة في شمال غرب ليبيا. مجلة كلية التربية، جامعة الفاتح، ليبيا. (6): 213 – 221.

الشعبي، صلاح ومطرود، لينا. (2002). دراسة مختبرية لتقويم فاعلية عزلات مختلفة من أنواع فطور الترايكوديرما تجاه بعض الفطور الممرضة المنقولة بالتربة. مجلة وقاية النبات العربية. 83:20-77.

الصايغ، غادة. (2017). دراسة تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* في تثبيط الفطر *Fusarium oxysporum* fragariae، مجلة جامعة البعث، 8(39): 39 – 52.

العربي، خديجة فرج؛ العامري، نورية علي والدنقلي، الزروق أحمد. (2009). حصر الأمراض المعدية على أشجار الزيتون بالمناطق الغربية من ليبيا، مجلة جامعة ناصر الأممية، ليبيا. (4): 204 – 218.

زيدان، فاتح؛ نافع، محمد والفار، إسماعيل. (2017). أول تسجيل لمرض الذبول الفيوزارمي على أشجار الزيتون بمنطقة بني. وليد – ليبيا. مجلة جامعة بني وليد للعلوم الإنسانية والتطبيقية. 2 (5): 222 – 231.

زيدان، فاتح؛ نافع، محمد والفار؛ إسماعيل. (2013). عزل وتعريف الفطريات التي تصيب أشجار الزيتون، المجلة المصرية للعلوم التطبيقية. 28 (8): 159- 170.

Agrios, G. N. (1997). Plant *pathology* 5th, Academic press, 922pp.

Akrami Mohammad. (2015). Effects of *Trichoderma* spp. in *Bio*-controlling *Fusarium solani and F. oxysporum* of Cucumber (*Cucumis sativus*) J. Appl. Environ. *Biol*. Sci., 4(3)241 - 245.

Aly, A. A., M. A. Abdel-Sattar, M. R. Omar and K.A. Abd-Elsalam. (2007). Differential antagonism of *Trichoderma* sp. against *Macrophomina phaseolina*. Journal of Plant Protection Research, 47: 122 - 129.

Barnes, E. H. and Hunter, B. B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi, Burgess publishing company, Minnesota. 241pp.

Barreto, D., Babbitt, S., Gally, M., and Perez, B. A. (2003). *Nectria haematococca* causing Root Rot in Olive Greenhouse Plants. INTA, Argentina, RIA, 32 (1): 49-55.

Bell, D. K., H. D. Wells, and C.R. Markham. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* specics against six fungal plant pathogen. *Phytopathology*. 72: 379 – 382.

Bokhari Najat A. and Kahkashan Perveen. (2012). Antagonistic action of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Fusarium solani* causing root rot of tomato. African Journal of *Microbiology* Research Vol. 6(44), pp. 7193 - 7197.

Chliyeh, M. Youssef R, Karima S, Amina O. Touhami, Abdelkarim Filahi-M, A. Moukhli, Ahmed O, Rachid B. and Allal D. (2014). Survey of the Fungal Species Associated to Olive-tree (*Olea europaea* L.) in Morocco. Int. J. *Biotech*. 2(2): 15 - 32.

Hamid N, Boughalleh – M., Souli M., Ben Salem I., and E.M. Romdhani. (2011). Screening of fungi implacted in the dieback of olive trees (*Olea europaea* L.) in Chebiks, s area. Research in plant *Biology*, 1(4): 33 – 34.

Hernández, M. E., Sánchez, A. Ruiz Dávila., A, Perez de Algaba., M. A. Blanco López and A. Trapero Casas. (1998). Occurrence and *Etiology* of death of young olive trees in southern Spain. European Journal of plant *pathology*. 104(4): 347 – 357.

Harman, G. E., Viterbo A., Chet, I. and Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species opportunistic a virulent plant symbionts. Nature reviews *Microbiology*. 2:43 - 56.

Maroua Ben Amiraa, David Lopeza, Ali Triki Mohamedc, Ali Khouajab, Hatem Chaard, Boris Fumanala, Aurélie Gousset-Duponta, Ludovic Bonhommee, Philippe Labela, Pascale Goupila, Sébastien Ribeiroa, Valérie Pujade-Renauda,f, Jean-Louis Juliena, Daniel Auguing, Jean-Stéphane Venissea. (2017). Beneficial effect of

Trichoderma harzianum strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees. *Biological* control, 70 – 78.

Masunaka, A., M. Hyakumachi and S. Takenaka. (2011). Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of Lotus japonicus. Microbes and Environments, 26: 128 - 134.

Mousa, M.S., M.K. Ali., A.A. Mosa and I.S. Elewa. (2006). Root rot disease of olive transplants and its *Biological* control. Arab Univ. J. Agric. Sci., Ain Shams Univ., Cairo. 14(1), 395 – 409.

Munjal, R. L., Kaul J, L. and Thakur M. S. (1982). Studies on diseases of olive in himachal pradesh. In: improvement of forest biomass. Symposium proceeding. Indian society of tree scientists. 437 – 440.

Sallam, N. M. A., K. A. M., Abo–Elyousr and M. A. E. Hassan. (2008). Evaluation of *Trichoderma* species as biocontrol agents for damping – off and wilt diseases of *Phaseolus vulgaris* L. and efficacy of suggested formula. Eygpt J. *Phytopathol,* 36(1 - 2): 81 - 93.

Sanei, S.J. and S. E. Razavi. (2012). Survey of fungal disease in north Iran. Annual review & research in Biology, 2(1): 27 – 36.

Summerell, B. A., B. Salleh, and J. F. Leslie. (2003). A utilitarian approach to *Fusarium* identification. Plant Disease 87: 117 - 128. (P, 11, 12).

Sood, Monika, Dhriti Kapoor, Vipul Kumar, Mohamed S. Sheteiwy, Muthusamy Ramakrishnan, Marco Landi, Fabrizio Araniti and Anket Sharma. (2020). *Trichoderma:* The "Secrets" of a Multitalented Biocontrol Agent. Plants www.mdpi.com/journal/plants.

Siameto, E. N., Okoth, S., Amugune, N. O. (2010). Antagonism of *Trichoderma harzianum* isolates on soil borne plant *pathogenic* fungi from Embu District, Kenya. Journal of Yeast and Fungal Research, 1, 3, 47 - 54.

Suarez, M., Carol, L., Fernandez, B. R., Osvaldo, V. N. ,Gamez, C. (2008). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Revista colombiana *biotechnología*, Colombie, 10, 2, 35 - 43.

Sunil, C., Dubey, M., Suresh,M., Birendra, S. 2007. Evaluation of Trichoderma species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of *chickpea* wilt. *Biological* Control India, 40, 118 – 127.

Tahia, B., Ana. M., Rincon,M., Carmen, L., Codón, C. A. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains Departament of *Biological* University .Spain, 7, 4, 249 - 260.

Vettraino, A. M. S. Camillo de Lellis, G. P. Shrestha, Kirtipur, Kathmandu, and A. Vannini, S. (2009). First Report of *Fusarium solani* Causing Wilt of *Olea europaea* in Nepal. (Abstract). The American *Phytopathologica*l Society. 39 (2): 200.1 - 200.1.

Vinale Francesco, Krishnapillai Sivasithamparam, Emilio L. Ghisalberti, Sheridan L. Woo, Marco Nigro, Roberta Marra, Nadia Lombardi, Alberto Pascale, Michelina Ruocco, Stefania Lanzuise, Gelsomina Manganiello and Matteo Lorito. (2014). *Trichoderma* Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens, The Open *Mycology* Journal, 8, 127 – 139.

Control of Fusarium Wilt Disease on the Olive trees Caused by *Fusarium solani*

Fateh Zidan[1], Isa Khalifa Ahmouda[2]
[1]**Department Plant Protection, Faculty of Agriculture/University Bani Waleed, Libya.**
[2]**Collage Higher Institute of Green Agricultural Technology, Tarhona, Libya.**
Zidan49104@yahoo.com

Abstract:

The results showed a high efficiency of biological control agent for *T. longibrachiatum* in inhibiting *Fusarium solani* that causes wilt and root rot disease of Olive tree, as the inhibiting ratio reached 2 on the Bell scale, and it achieved a clear control over the growth of the pathogenic fungus by inhibiting the growth of aerial fungal hyphae on PSA. Culture media. It was also clear that macroconidia also showed its transformation from crescent shape to straight shape, thickening of transverse septa, and cell separation from each other. The results of the statistical analysis also showed that the addition of the biological control agent *T. longibrachiatum* 1% to the soil contaminated with the pathogen *Fusarium solani* for olive trees in the same proportion led to a reduction in the infection rate of olive trees seedlings of Al-chemleli and Coratina cultivars, the severity of the disease was 16.66 and 19.52%, and the infection rate was 24.57 and 27.59%, respectively for olive seedlings, compared to the severity of the disease, which amounted to 63.33 and 67.43%, and the infection rate 72.67 and 81.71% in the soil contaminated with the pathogenic fungi only. There were no significant differences between olive varieties, and the occurrence of ulceration of market bases, root rot and rapid wilt, it led to the death of seedlings of the infected AL-chemleli and Coratina cultivars.

Keywords:.*Biological* control, Olive root rot, Fungus, *Fusarium solani*, *T. longibrachiatum*.