



تحديد وتوصيف جينات المكافحة الحيوية في عزلات الترايكوديرما ووظائفها

ضد مسببات الأمراض النباتية الفطرية ساكنة التربة

مقدمة من

ندى فتحي حميدة أحمد

كجزء من متطلبات الحصول على

درجة دكتوراه الفلسفة في العلوم الزراعية

(وراثية)

قسم الوراثة

كلية الزراعة بالفيوم

جامعة الفيوم

٢٠١٣

تحديد وتوصيف جينات المكافحة الحيوية فى عزلات التراكوديرما ووظائفها
ضد مسببات الأمراض النباتية الفطرية ساكنة التربة

مقدمة من

ندى فتحي حميدة أحمد

بكالوريوس فى العلوم الزراعية (أمراض نبات)

كلية الزراعة بالفيوم - جامعة القاهرة (١٩٩٨)

ماجستير فى العلوم الزراعية (الوراثة)

كلية الزراعة - جامعة الفيوم (٢٠٠٦)

للحصول على درجة

دكتوراه الفلسفة فى العلوم الزراعية

(وراثة)

وقد تمت مناقشة الرسالة والموافقة عليها

اللجنة

أ.د. / سمير عبد العزيز ابراهيم

استاذ الوراثة المتفرغ بكلية الزراعة - جامعة عين شمس

أ.د. / محمد سراج الدين عبد الصبور

استاذ الوراثة المتفرغ بكلية الزراعة - جامعة بنها

أ.د. / زكى أحمد عطية الفقى

استاذ الوراثة ووكيل كلية الزراعة لشئون التعليم والطلاب - جامعة الفيوم

د/ جمال محمد حسان

استاذ الوراثة المساعد بكلية الزراعة - جامعة الفيوم

/ / تاريخ الموافقة

تحديد وتوصيف جينات المكافحة الحيوية فى عزلات الترايكوديرما ووظائفها
ضد مسببات الأمراض النباتية الفطرية ساكنة التربة

مقدمة من

ندى فتحي حميدة أحمد

للحصول على درجة

الدكتوراه الفلسفة فى العلوم الزراعية

(وراثة)

لجنة الاشراف العلمى:

أ.د. / زكى أحمد الفقى

استاذ الوراثة بزراعة الفيوم

د/ جمال محمد حسان

استاذ الوراثة المساعد بزراعة الفيوم

أ.د/ مكرم أحمد محمد سيد

استاذ سمية المبيدات بزراعة الفيوم

قسم الوراثة

كلية الزراعة – جامعة الفيوم

الملخص العربى

أجريت هذه الدراسة فى قسم الوراثة - كلية الزراعة - جامعة الفيوم خلال الفترة من 2007 وحتى 2012 وقد شملت الدراسة ثمانية عشر عزلة من فطر الترايكودرما *Trichoderma* والتي سبق عزلها من التربة الملامسة لجذور نباتات مختلفة (الفاصوليا، اللوبيا، الخيار، الفول البلدى، القمح) منزرعة بمحافظة الفيوم- مصر. بالاضافة الى سلالتين معرفتين هما *T. koningii*، *Trichoderma harzianum* تم الحصول عليها من مركز الثروة الميكروبية - كلية الزراعة- جامعة عين شمس- مصر وتهدف هذه الدراسة الى :-

(١) توصيف عزلات الترايكوديرما باستخدام الخواص المورفولوجية والجزيئية.
(٢) تقييم إمكانات العزلات فى المقاومة البيولوجية لفطر الرايزوكتونيا سولانى معمليا وتحت ظروف الصوبة .

(٣) عزل وإنتاج انزيمى كيتينيز *chitinase* وسليوليز *cellulase* لعزلات الترايكوديرما.

(٤) عزل جينات كيتينيز وسليوليز الخاصة بهم، والكشف عن تسلسل هذه الجينات.

ويمكن تلخيص أهم النتائج المتحصل عليها كما يلى:

تم عزل ثمانية عشر عزلة من فطر الترايكودرما من ريزوسفير نباتات الفاصوليا واللوبيا والفول البلدى والخيار والقمح. وتم تعريفهم ظاهريا وتحت الميكروسكوب الى ثلاثة مجموعات

المجموعة الاولى تشمل ٩ عزلات وتتبع جنس ترايكودرما هارزيانم *Trichoderma*

harzianum والمجموعة الثانية تضم سبعة عزلات من جنس ترايكودرما كوننجاي

Trichoderma koningii فى حين كانت المجموعة الثالثة ترايكودرما فيردى *Trichoderma*

viride وتضم عزلتين فقط.

وبدراسة كفاءة عزلات فطر الترايكودرما فى التضاد لفطر الرايزوكتونيا سولانى فى

المعمل، أظهرت عزلات الترايكودرما تأثيرا مضادا للفطر المسبب لمرض عفن الجذور حيث أنها

تثبط نمو الريزوكتونيا سولاني. و أظهرت العزلة FUE3 أعلى تثبيط (٧٧.٥٧٪) من النمو رايزوكتونيا سولاني ومن ناحية أخرى، أظهرت العزلة FUE2٠ أقل تثبيط (٢٥,٣٣٪). في حين أعطت العزلات المتبقية تثبيط بقيم متوسطة بين هاتين القيمتين .

تحت ظروف الصوبة حدث انخفاض كبير في نسب الاصابة بعد ١٥ و ٣٠ يوما من الزراعة. و أدت أقوى العزلات FUE6 و *T. koningii* 118 الى تقليل شدة الاصابة بمرض سقوط البادرات المفاجئ بنسبة ٩٦٪ مقارنة بالكنترول. ويعزى التباين بين السلالات في مكافحة المرض الى مقدرتها على التطفل الفطري وانتاج المواد المثبطة اضافة الى اختلافها في المحتوى الجيني .

وأشارت النتائج إلى أن الحد الأقصى لمقدار انزيم الكيتينيز ٠.٠18 ملغ/مل تفرز من قبل العزلة 18 ا. والحد الأدنى من الكيتينيز ٠,٠٠٤٧ ملغ/مل تفرز من قبل العزلات 12 و FUE10. بينما إفراز الكيتينيز من قبل بقية عزلات الترايكوديرما تراوحت ما بين ٠.٠17 حتي 0.005 ملغ/مل. في حين أشارت النتائج إلى أن الحد الأقصى لمقدار انزيم السليوليز 0.075 ملغ/مل تفرز بواسطة العزلة FUE5 و الحد الأدنى من السليوليز 0.006 ملغ/مل تفرز بواسطة العزلات FUE8 و FUE13، في حين باقى العزلات العزلات تراوحت كمية إفرازها للسليوليز ما بين 0.035 حتي 0.007 ملغ/مل.

كان ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل الـ PCR لمنطقة rDNA لجميع العزلات الستة متشابهة من حيث الحجم في هذه المنطقة حيث تم الحصول على حزمة واحدة ذات وزن جزيئى يتراوح بين ٥٦٠ حتي ٦٠٠ زوج من القواعد. وباجراء التحليل الوراثى Dendrogram تم الحصول على أعلى نسبة تشابه (١٠٠٪) بين العزلات FUE5، FUE6، و FUE3، و FUE5. في حين تم الحصول على أقل تشابه (٩٢٪) بين العزلة FUE15 وجميع العزلات باستثناء العزلة FUE9 كانت نسبة التشابه بينها وبين العزلة FUE1٥ (٩٣٪). واستنادا إلى

مجممل النتائج التي تم الحصول عليها تم تقسيم العزلات الستة إلى مجموعتين رئيسيتين. المجموعة الاولى تشمل سلالة *T.harzianum* (FUE15) والثانية تضم (FUE3، FUE5، FUE6، وFUE9 (I18 *T. konigii*. تم عزل وتوصيف جين chitinase من ٤ عزلات (FUE3، FUE5، FUE9، وI18) وقد أظهرت نتائج التفريد الكهربى على الاجاروز حزمة واحدة ويعمل تحليل تتابع للنوكليوتيدات كانت ذات طول من ١٠٣٩ زوج من القواعد والتي تشفر الى ٣٤٤ حمض امينى.

تم عزل وتوصيف جين cellulase من عزلة (FUE15) وقد أظهرت نتائج التفريد الكهربى على الاجاروز حزمة واحدة ويعمل تحليل تتابع للنوكليوتيدات كانت ذات طول من ٢٠٤ زوج من القواعد والتي تشفر الى ٦٨ حمض امينى.