الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة فرحات عباس **كلية علوم الطبيعة والحياة**

سطيف **قسم الأحياء الدقيقة**

مذكـرة

مقدمة من طرف الطالبة:

منازل سعاد

لنيل شهادة **الماجستير** في علم الأحياء الدقيقة

تخصص: **هندسة ميكروبيولوجية**

الفطريات الملوثة لبذور الذرة (*Zea mays*) والمكافحة البيولوجية للفطر *Fusarium moniliforme*.

قدمت أمام لجنة المناقشة المكونة من السادة:

الأستاذ غول مصطفى	**رئيسا**	أستاذ بجامعة سطيف
الأستاذ لعروس العربي	**مشرفا**	أستاذ بجامعة سطيف
الدكتور زروق محمد ميهوب	**ممتحنا**	أستاذ محاضر بجامعة سطيف
الدكتور بلحطاب رشيد	**ممتحنا**	أستاذ محاضر بجامعة سطيف

2011-2010

الخاتمة

مكنت هذه الدراسة من التعرف على الأنواع الفطرية الملوثة لبذور الذرة التي تم جلبها من ولايتي سطيف والجزائر العاصمة. حيث تم عزل مجموعة من الفطريات تنتمي إلى الأجناس *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* بالإضافة إلى فطريات أخرى مثل: *Cladosporium*، *Rhisopus*، *Basiptospora*، و*Alternaria*، و *Ovilariopsis*. كما تم التعرف على الظروف المثلى لنمو الفطر السائد *F. moniliforme* . وقد وجد أن لكل من *T. harzianum* وخميرة *D. hansenii* القدرة على تثبيط نمو الفطر *F. moniliforme* على مستوى المخبر. كما وجد أن *D. hansenii* لها القدرة على تثبيط نمو الفطر في المخازن المصغرة تحت ظروف السد المحكم. و التي تعتبر إحدى طرق تخزين الحبوب، لما لها من مزايا كالخفض من إصابة الحبوب المخزنة بالفطريات، والمحافظة على حيويتها. مما يفسح المجال لاستغلال هذه النتائج وتطبيقها على أرض الواقع. و البحث عن خمائر أخرى لها القدرة على تثبيط نمو الفطريات أثناء التخزين، والدراسة الدقيقة لآليات تأثيرها، و عزل وتنقية المواد الفعالة المثبطة التي تفرزها، بالإضافة إلى البحث عن إمكانية تثبطها لإفراز السموم.

الفصل الأول

مراجعة المصادر

الفصل الثاني

المواد والطرق

الفصل الثالث

النتـائج

الفصل الرابع

المنـاقشة

المحتويات

مقدمة..... 1

الفصل الأول: مراجعة المصادر

1 – تلوث البذور بالفطريات 2

1-1- فطريات الحقل.....3

1-2- فطريات التخزين.....4

1-3- تأثير الفطريات على الحبوب المخزنة.....4

1-4- أهمية البذور في نقل الأمراض 6

2- الأهمية الاقتصادية للذرة 6

3- فطر *Fusarium* 7

3-1- الأهمية الاقتصادية.....7

4- السموم الفطرية 8

4-1- سم Fumonisin 9

4-2- الخصا ئص الفيزيائية والكيميائية لـ Fumonisin.....15

5- العوامل المؤثرة على النمو وإفراز السموم 10

5-1- درجة الحرارة 10

5-2- الرطوبة.....12

5-3- درجة الأس الهيدروجيني (pH).....13

5-4- المحيط الغازي 13

5-5- المواد الغذائية.....14

5-6- وجود فطريات أخرى 15

6 – المكافحة البيولوجية.....15

6-1- استعمال الفطريات في المكافحة البيولوجية 16

6-2- آليات المكافحة لدى فطر *Trichoderma harzianum* 17
6-2-1- التنافس على المكان والغذاء 23
6-2-2- التطفل الفطري 18
6-2-3- استحداث المقاومة لدى النبات العائل 18
6-2-4 - إنتاج المضادات الحيوية 19
6-3- المكافحة البيولوجية باستعمال الخمائر 20
6-4- آليات المكافحة البيولوجية لدى الخمائر 20
6-4-1- السموم القاتلة (Killer toxin) 20
6-4-2- التنافس على المكان والغذاء 21
6-4-3- إنتاج المضادات الحيوية 23
6-4-4- التطفل 23
6-4-5- إنتاج الإنزيمات المحللة 23

الفصل الثاني: المواد والطرق

1- جلب العينات 25
2- قياس الرطوبة النسبية 25
3- عزل الفطريات الداخلية والخارجية للذرة 25
3-1- عزل الفطريات الداخلية 25
3 -2- عزل الفطريات الخارجية 26
4- تشخيص الفطريات المعزولة 26
4-1- تحديد الأجناس 26
4-2- تحديد الأنواع 27
4-3- تشخيص أنواع *Fusarium* 29
5 - الاختبار البيولوجي لعزلات *F. moniliforme* 29

6- الدراسة الفسيولوجية لفطر *F. moniliforme* 31
6-1- تأثير درجة الحرارة على النمو 32
6-2- تأثير وسط الزرع على النمو 32
6-3- تأثير درجة الأس الهيدروجيني على النمو 32
6-4- تأثير الرطوبة النسبية (RH%) على النمو 32
6-5- تأثير مصدر الكربون على النمو 32
6-6- تأثير مصدر الآزوت على النمو 32
7- المستقلبات الثانوية لفطر 32
7-1- إنتاج السموم الفطرية 32
7-2- الاستخلاص 33
7-3- الفصل بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة 33
8- المكافحة البيولوجية 34
8-1- المكافحة البيولوجية باستعمال *T. harzianum* 34
8-1-1- الزرع الثنائي 35
8-1-2- الزرع على الشريحة 35
8-1-3- تأثير المواد الأيضية الطيارة المفرزة من طرف *T. harzianum* 36
8-1-4- تأثير المواد الأيضية غيرالطيارة المفرزة من طرف *T. harzianum* 36
8-1-5- إنتاج وفصل المستقلبات الثانوية لـ *T. harzianum* 37
8-2 - المكافحة البيولوجية باستعمال خميرة *Debaryomyces hansenii* 38
8-2-1- تثبيط الخميرة لنمو الفطر 38
أ- تثبيط الفطر وفق طريقة Elwakil وآخرون (2009) 38
ب- تثبيط الفطر وفق طريقة Raspor وآخرون (2010) 38
8-2-3- تأثير المواد الأيضية غير الطيارة المفرزة من طرف *D. hansenii* 39
8-2-4- مكافحة الفطر في المخازن المصغرة(*mini silo*) 41

الفصل الثالث: النتائج

1- الرطوبة النسبية 43

2- عزل الفطريات الفطريات الملوثة لبذور الذرة 43

2-1- عزل وتشخيص الفطريات الداخلية 43

2-2- عزل وتشخيص الفطريات الخارجية 44

3- الاختبار البيولوجي لعزلات *F. moniliforme* 46

4- فطر *F. moniliforme* 46

5- الدراسة الفيزيولوجية لفطر *F. moniliforme* 51

5-1- تأثير درجة الحرارة على النمو 51

5-2- تأثير وسط الزرع على النمو 51

5-3- تأثير درجة الأس الهيدروجيني على النمو 51

5-4- تأثير الرطوبة النسبية (RH%) على النمو 53

5-5- تأثير مصدر الكربون على النمو 53

5-6- تأثير مصدر الآزوت على النمو 53

6- استخلاص السموم الفطرية 55

7- المكافحة البيولوجية 59

7-1- المكافحة البيولوجية باستعمال *T. harzianum* 59

7-2- المكافحة البيولوجية باستعمال خميرة *D. hansenii* 62

الفصل الرابع: المناقشة 64

الخاتمة 75

الملخص 76

المراجع 77

الملحق..... .....
90

المراجع:

1- **Alam, S., Shah, H. U., and Magan, N**. **2009**. Water availability affects extracellular hydrolytic enzymes production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. World Mycotxin Journal. **2**: 313-322.

2- **Alam, S., Shah, H. U., Saleemullah, and Riaz, A**. **2007.** Comparative studies on storage stability of ferrous iron in whole wheat flour and flat bread (naan). Int. J. Food Sci. Nutr. **58**: 54-62.

3- **Alberts, J. F., Gelderblom, W. C. A., Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Van Schalkwyk, D. J., and Behrend, y**.**1990**. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 1729-1733.

4- **Alkadeeb, A. S. 2004**. L-Serane dyhydratase formation in *Fusarium moniliforme*. Pak. J. Boil. Sci. **7**: 1181-1185.

5- **Amadi, J. E., and Adeniyi, D. O. 2009**. Mycotoxin production by fungi isolated from stored grains. Afr. J. Biotechnol. **8**: 1219-1221.

6- **Andrade, M. J., Cordoba, J. J., Casado, E. M., Cordoba, M. G., and Rodriguez, M**. **2010**. Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage "salchichón". Meat Science. **85:** 256-264.

7- **Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L. G., Heraud, C., and Steinberg, C. 2010**. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani.* Fungal Biology. **59:** 1-11.

8- **Aneja, M., Gianfagna, T. J., and Hebbar, P. K. 2005**. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology. **67**: 304-307.

9- **Anonyme. 2008.** Food and Agriculture Organization Statistical Database. Rome. Italy.

10- **Arras, G., De Cicco, V., Arru, S., and Lima, G. 1998**. Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. J. Hortic. Sci. Biotechnol. **73**: 413-418.

11- **Attrassi, K., Benkirane, R., Attarassi, B., Badoc, A., et Douira, A. 2007.** Effet de la source de carbone et d'azote sur la croissance et la sporulation de moisissures des pommes en conservation. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. **146**: 211-224.

12- **Aziz, N. H., El-Far, F. M., Shahin, A. M., and Roushy, S. M**. **2007**. Control of *Fusarium* moulds and fumonisin B1 in seeds by gamma-irradiation. Food Control. **18**:1337-1342.

13- **Bar-Shimon, M., Yehuda, H., Cohen, L., Weiss, B., Kobeshikov, A., Daus, A., Goldway, M., Wisniewski, M., and Droby, S. 2004**. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by yeast biocontrol agent *Candida oleaphila.* Curr Gent. **45:** 140-148.

14- **Bekada, A. M. A., Benakriche, B., Hamadi, K., and Bensoltane , A. 2008.** Modelling of effects of water activity, pH and temperature on the growth rate of *Mucor racemosus* isolated from soft camembert cheese. World J. Agric. Sci. **4**: 790-794.

15- **Benitez, T., Rincon, M. A., Limon, M. C. and Codon, C. A. 2004.** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Int. Microbiol. **7**: 249-260.

16- **Bennett, J. W., and Klich, M**. **2003**. Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev.**16**: 497-516.

17- **Berghofer , L. K., Hocking, A. D., Miskelly, D., and Jansson, E**. **2002**. Microbiology of wheat and flour milling in Australia. Int. J. Food Microbiol. **85**: 137-149.

18- **Bertagnolli, B.L., Daly, S., and Sinclair, B. 1998**. Antimycotic compounds from the plant pathogen *Rhizoctonia solani* and its antagonist *Trichoderma harzianum*. Phytopathology. **146**: 131-135.

19- **Blesa, J., Meca, G., Rubert, J., Soriano, J. M., Ritieni, A., and Manes, J**. **2010.** Glucose influence on the production of T_2-toxin by *Fusarium sporotrichioides.* Toxicon. **55**: 1157-1161.

20- **Bluhm, B. H., and Woloshuk, C. P. 2005.** Amylopectin induces fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. American Phytopathological Society. **18**: 1333-1339.

21- **Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M-C., and Toldrá, F**. **2008**. Purification and characterisation of proteases A and D from *Debaryomyces hansenii*. Int. J. Food Microbiol. **124**: 135-141.

22- **Boonyapranai, K., Tungpradit, R., Lhieochaiphant, S., and Phutrakul, S**. **2008.** Optimization of submerged culture for the production of naphthoquinones pigment by *Fusarium verticillioides.* Chiang. Mai. J. Sci. **35**: 457-466.

23- **Botton, B., Breton, A ., Fevre, M., Gauthier, S ., Guy, P. H ., Larpent, J. P., Reymond, P., Sanglier, J.J ., Vayssier, Y., et Veau, P. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, 2eme Ed. Masson (Paris). 512P.

24- **Brase, S., Encinas, A., Keck,J., and Nising, C. F. 2009**. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. Chem. Rev. **109**: 3903-3990.

25- **Cariens-fuller, V., Aldred, D., and Magan, N. 2005.** Water, temperature and gas composition interaction after growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucusum* on weat grain. J. Appl. Microbiol. **99**:1215-1221.

26- **Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., and De Cicco, V. 1997**. ß-1,3-Glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. Postharvest Biol. Technol. **12**: 293-300.

27- **Chakrabarti, D. k., and Ghosal, S**. **1986.** Occurrence of free and conjugated 12,13-epoxytrichothecenes and zearalenone in banana fruits infected with *Fusarium moniliforme.* Appl. Envir. Microbiol. **51**: 217-219.

28- **Champion , R. 1997**. Identifier les champignons transmis par les semences. Institut Nationale de la Recherche Agronomique. Paris. pp : 27-169.

29- **Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa, P., and Panijpan, B**. **2007**. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). Biological Control. **42**: 326-335.

30- **Chelkowski, J., and Lew, H**. **1992.** *Fusarium* species of *Liseola* section occurrence in cereals and ability to produce fumonisins. Microbiol. Alim. Nutr. **10**: 49-53.

31- **Chen, M. H., and Jonhs, M. R**. **1993**. Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*. Appl. Microbiol. Biotech. **40**: 132-138.

32- **Chen, J., Mirocha, C. J., Xie, W., Hotgge, L., and Olson, D**. **1992**. Production of the mycotoxin fumonisin B1 by *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 3928-3931.

33- **Chi, Z-M., Liu, G., Zhao, S., Li, J., and Peng, Y. 2010**. Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. Appl. Microbiol. Biotechnol. **86**:1227-1241.

34- **Choudary, K. A., Reddy, K. R. N., and Reddy, M. S**. 2007. Antifungal activity and genetic variability of *Trichoderma harzianum* isolates. J. Mycol. Pl. Pathol. **37**: 1-6.

35- **Christensen, C. M**. 1975. Molds, mushrooms, and mycotoxins. Library of Congress Catalog Card Number: 74-21808. ISBN 0-8166-0743-5. pp: 65-77.

36- **Christensen, C. M., and Kaufmann, H. H. 1969.** Grain storage. The role of fungi in quality loss. University of Minnesota Press. pp: 17-35.

37- Correa, B. 2008. Relative populations and toxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in artificially inoculated corn at various stages of development under field conditions. J. Sci Food Agric. **88**: 48-55.

38- Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, M. J., Benitez, T., Pintor-Toro, A. J. and Lobell, A. 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma havzianum*. Eur. J. Biochem. **206**: 859-867.

39- Demain, A. L. **1986**. Regulation of secondary metabolism in fungi. Pure. Appl. Chem. **58**: 219-226.

40- Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D., and Wilson, C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? (Review). Postharvest Biol. Technol. **52**: 137-145.

41- Druvefors , U. A., Jonsson, N., Boysen, M. E, and Schnurer, J. 2002. Efficacy of the biocontrol yeast *Pichia anomala* during long-term storage of moist feed grain under different oxygen and carbon dioxide regimens. FEMS Yeast Research. **2**: 389-394.

42- Druvefors, U. A., and Schnurer, J. **2005**. Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. FEMS Yeast Research. **5**: 373-378.

43- Duarte, M. L. R., and Archer, S. A., 2003 .*In vitro* toxin production by *Fusarium solani* f. sp. *Piperis*. Fitopatol. Bras. **28**: 229-235.

44- Dubey, S. C., Suresh, M., Singh, B. **2007**. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. Biological Control .**40**: 118-127.

45- Elad, Y. and Kapat, A. **1999.** The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant Pathol. **105**: 177-189.

46- El-Bahrawi, S. **1977**. Survey of some *Fusarium moniliforme* strains from different host plants for compounds possessing gibberellin-like activity. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg. **132**: 178-183.

47- El-Hasan, A., Walker, F., Schöne, J. and Buchenauer, H. **2007**. Antagonistic effect of 6-pentyl-alpha-pyrone produced by *Trichoderma harzianum* toward *Fusarium moniliforme.* J. Plant Dis. Protect. **114**: 62-68.

48- El-Hasan, A., Walker, F., and Schone, J. 2009. Detection of viridiofungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. Eur. J. Plant. Pathol .**124**: 457-470.

49- **El-Hasan, A., Walker, F., Schöne, J. and Buchenauer, H**. **2008.** *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme.* J. Phytopathology. **156**: 79-87.

50- **El-Katathy, M. H., Gudelj, M., Robra, K. H., Elnaghy, M. A. and Gübitz, G. M. 2001.** Characterization of a chitinase and an endo-β-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **56**: 137-143.

51- **El-Mehalawy, A. A**. **2004**. The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused by *Fusarium oxysporum.* Int. J. Agric. Biol. **6**: 310-316.

52- **El-wakil, M. A., Awadallah, O. A., El-Refai, I. M, El-Metwally, M. A., and Mohamed, M. S. 2009**. The use of bread yeast as biocontrol agent for controlling seed-borne fungi of faba bean. Plant Pathol. J. **8**: 133-143.

53- **El-Tarabily, K. A**. **2004**. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. J. Appl. Microbiol. **96**: 69-75.

54- **El-Tarabily, K. A., and Sivasithamparam, K. 2006.** Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Mycoscience. **47**:25-35.

55- **Emma, W. G., and Kotchoni, S. O**. **2008**. The use of *Trichoderma harzianum* and *T. viride* as potential biocontrol agents against peanut mycoflora and their effectivness in reducing aflatoxin contamination of infected kernels. Biotechnology. **7**: 439-447.

56- **Essono, G., Ayodele, M., Akoa, A., Foko, J., Olembo, S., and Gockowski, J**. **2007.** *Aspergillus* species on cassava chips in storage in rural areas of southern Cameroon: their relationship with storage duration, moisture content and processing methods. Afr. J. Microbiol. Res. **6**: 001-008.

57- **Fandohan, P., Gnonlonfin, B., Marasas, W. F. O., and Wingfield, M. J**. **2005**. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa. Int. J. Food Microbiol. **99**: 173- 183.

58- **Farooq, S., Muhammad Iqbal, M., and Abdul Rauf, C. 2005.** Physiological Studies of *Fusarium oxysporum* F. Sp. *Ciceri.* Int. J. Agric. Biol. **7**: 275-277.

59- **Felicia, W. 2007**. Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds. (Review). Ani. Feed Sci. Technol. **137**: 363-374.

60- **Figueira, E. L. Z., and Hirooka, E. Y. 2000**. Culture medium for amylase production by toxigenic fungi. Brazilian Archives of Biology and Technology. **43**: 461-467.

61- Fredlund, E., Druvefors, U., Boysen, M. E., Lingsten, K. J., and Scnurer, J. 2002. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. FEMS Yeast Research. **2**: 395-402.

62- Freire, F. d. C. O., Kozakiewicz, Z., and Paterson, M. 2000. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. Mycopathologia. **149**: 13-19.

63- Fremy, J. M. 2009. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. pp: 6-308.

64- Ghisalberti, E. L., and Sivasithamparam, K. **1991.** Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biology & Biochemistry. **23**: 1011-1020.

65- Guiraud, J. P. **1998.** Microboilogie alimentaire. Ed- L'usine nouvelle. Paris, 331 p.

66- Griffin, G. L. 1976. Roles of low pH, carbon and inorganic nitrogen source use in chlamydospore formation by *Fusarium solani*. Can. J. Microbiol. **22**: 1381-1389.

67- Hajieghrari, B., Torabi-Giglou, M., Mohammadi, M. R., anda Davari, M. 2008. Biological potantial of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. Afr. J. Biotechnol. **7**: 967-972.

68- Hanson, J. R., 2008. The Chemistry of Fungi. RSC Publishing. 221 p.

69- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, a virulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. **2**: 43-56.

70- Hashem, M., and Alamri, S. 2009. The biocontrol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. Postharvest Biol. Technol. **53**: 123-130

71- Hell, K., Cardwell, K. F., and Poehling, H. M. **2003**. Distribution of fungal species and aflatoxin contamination in stored maize in four agroecological zones in Benin, West-Africa. J. Phytopathol. **151**: 690-698.

72- Hell, K., Cardwell, K. F., Setamou, M., and Peohling, H. M. 2000. The influence of storage practices on aflatoxin contamination in maize in four agroecological zones of Benin, West Africa. J. Stored Prod. Res. **36**: 365-382.

73- Hernandez, A., Martin, A., Cordoba, M. G., Benito, M. J. Aranda, E., and Perez-Nevado, F. 2008. Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. Int. J. Food Microbiol. **121**: 178-188.

74- Hernandez-Montiel, L. G., Ochoa, J. L., Troyo-Diéguez, E., and Larralde-Corona, C. P. **2010**. Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican

lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. Postharvest Biol. Technol. **56**: 181-187.

75- Howell, R. C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis. **87**: 4-10.

76- Izgu, F., and Altinbay, D. 1997. Killer toxins of certain yeast strains have potential growth inhibitory activity on gram-positive pathogenic bacteria. Microbios. **89:** 15-22.

77- Izgu, F., Altinbay, D., and Acun, T. **2006**. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its *exo*- ß -1,3-glucanase activity. Enz. Microbial. Technol. **39**: 669-676.

78- James, C. 2002. Evaluation détaillée du maïs Bt. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. **29**:1-117.

79- Jung, H., Kim C., and Shin, C. S. 2003. Color characteristics of *Monascus* pigments derived by fermentation with various amino acids. J. Agric. Food. Chem. **51**: 1302-1306.

80- Kaaya, A.N., and Kyamuhangire, W. **2006**. The effect of storage time and agroecological zone on mould incidence and aflatoxin contamination of maize from traders in Uganda. Int. J. Food. Microbiol. **110**: 217-23.

81- Kaewchai, S., Soytong, K., and Hyde, K. D. 2009. Mycofungicides and fungal biofertilizers. Fungal Diversity. **38**: 25-50.

82- Kausar, P., Chohan, S., and Parveen, R. **2009**. Physiological studies on *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani*, the cause of Shesham decline. Mycopath. **7**: 35-38.

83- Keller, S. E., Sullivan, T. M., and Chirtel, S. 1997. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. Indust. Microbial. Biotechnol. **19**: 305-309.

84- Khosravi, A. R., Mansouri, M., Bandour, A. R., and Shokri, H. 2007. Mycoflora of maize harvested from Iran and imported maize. Pak. J. Biological Sci. **10**: 4432-7737.

85- Klich, M. A. 2007. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Mycoscience **48**: 71-80.

86- Kollu, N. R., Girisham, S., and Reddy, S. M. **2009**. Incidence of toxigenic *Fusaria* in feeds of Godavari belt area of Andhra Pradesh, India. Afr. J. Microbiol. Res. **3**: 119-122.

87- Kuçuk, C., and Kivanç, K. 2008. Mycoparasitism in the biological control of *Gibberella zeae* and *Aspergillus ustus* by *Trichoderma harzianum* Strains. J. Agric. Technol. **4**: 49-55.

88- Kumar, V., Basu, M. S., and Rajendran, T. P. **2008**. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities (Review). Crop Protection. **27**: 891-905.

89- Laitila, A., Wilhelmson, A., Kotaviita, E., Olkku, J., Home, S., and Juvonen, R. **2006**. Yeasts in an industrial malting ecosystem. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **33**:953-966.

90- Lee, H. B., and Magan, N. **2010**. The influence of environmental factors on growth and interactions between *Embellisia allii* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolated from garlic. Int. J. Food Microbiol. **138**: 238-242.

91- Li, S. X., Chen, M. F., Liu, B. W., Liao, T. X., Wang, G. X., Zheng, S. R., Chen, W., Yuan, H. B., Chen, R. R., and Huang, J. J. 1990. T_2-toxin produced from a mould - *Fusarium moniliforme*. Journal of Toxicology. **9**: 104-109.

92- Li, Q., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G., and Hsiang, T. **2010.** Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on citrus microcarpa. Postharvest Biol. Technol. **58**: 157-165.

93- Liu, S-Q., and Tsao, M. 2009. Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. Food Control. **20**: 852-855.

94- Lo, C.T, and Lin, C. Y. 2002. Screening strains of *Trichoderma* spp. for plant growth enhancement in Taiwan. Plant pathology Bull. **11**: 215-220.

95- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti,A., and Perrone, G. **2003**. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops**.** Eur. J. Plant Pathol. **109:** 645-667.

96- Logrieco, A., Mulé, G., Moretti, A., and Bottalico. A. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. Eur. J. Plant Pathol.**108**: 597-609.

97- Marin, S., Sanchis, V., and Magan, N. 1995. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. Can. J. Microbiol. **41**:1063-1070.

98- Marquina, D., Barroso, J., Santos, A., and Peinado, J. M. **2001.** Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin. Microbiol. Res.**156**: 387-391.

99- Masih, E.I., and Paul, B. 2002. Secretion of beta-1,3-glucanase by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing mold disease of the grapevine. Curr. Microbiol. **44**:391-395.

100- Mazza, G., **1983.** Rapid assay for detection of microorganisms producing DNA-damaging metabolites. Appl. Environ. Microbial. **45**:1949-1952.

101- Menniti, A. M., Gregori, R., and Neri, F. 2010. Activity of natural compounds on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production in stored maize kernels. Int. J. Food Microbiol. **136**: 304-309.

102- Mercier, J., and Wilson, C. L. **1994.** Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. Biol. Control. **l 4**:138-144.

103- Mogensen, J. M., Nielsen, K. F., Samson, R. A., Frisvad, J. C. and Thrane, U. 2009. Effect of temperature and water activity on the production of fumonisins by *Aspergillus niger* and different *Fusarium* species. BMC Microbiology. **9**: 281-293.

104- Mokiou, S., and Magan, N. 2008. Physiological manipulation and formulation of the biocontrol yeast *Pichia anomala* for control of *Penicillium verrucosum* and ochratoxin A contamination of moist grain. Biocontrol. Sci. Technol. **18**: 1063-1073.

105- Montealegre, J., Valderrama, L., Sanchez , S., Herrera, R., Besoain, X., and Perez, L. M. **2010**. Biological control of *Rhizoctonia solani* in tomatoes with *Trichoderma harzianum* mutants. Electronic Journal of Biotechnology ISSN. **13:** 01-11.

106- Nakai, V. K., Rocha, L., Gonçalez, E., Fonseca, H., Ortega, E. M. M., and Correa, B. 2008. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. Food Chemistry. **106**: 285-290.

107- Nelson, P. E., Dignani, M. C., and Anaissie, E. J. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. Clin. Microbiol. Rev. **7**: 479-504.

108- Neergard, P. **1977**. Seed pathology. The Macmillan press L. T. D, London. pp: 87-514.

109- Nicolie, B., Bernier, B., et M. Drouet. **2009.** Allergie au maïs. Revue Française d'Allergologie. **49 :** 547-553.

110- Noronha, E. F., Kipnis, A., Junqueira-Kipnis, A.P., and Ulhoa, C. J. 2000. Regulation of a 36-kDa β-1, 3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiol. Lett. **188**: 19-22.

111- Pfohl-Leszkowicz, A. 2001. Les mycotoxines dans l'alimentation. évaluation et gestion du risque. Ed. Tec & Doc. pp : 3-17.

112- Pitt, J. I., and Hocking, A. D. 1985. Fungi and food spoilage. Academic Press, London. 412 p.

113- Polizzi, V., Adams, A., Picco, A. M., Adriaens, E., Lenoir, J., Peteghem, C. V., Saeger, S. D, and Kimpe, N. D. 2011. Influence of environmental conditions on production of volatiles by *Trichoderma atroviride* in relation with the sick building syndrome. Building and Environment. **46**: 945-954.

114- Rajendiran, R., Jegadeeshkumar, D., Sureshkumar, B. T., and Nisha, T. 2010. *In vitro* assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post harvest pathogens. J. Agric. Technol. **6**: 31- 35.

115- Ramada, M. H. S., Lopes, F. A, C., Ulhoa, C. J., and Silva, R. d. N. 2010. Optimized microplate β-1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. Screening. Journal of Microbiological Methods. **81**: 6-10.

116- Ramanathan, G., Banupriya, S., and Abirami, D. 2010. Production and optimization of cellulase from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation. J. Sci. Indust. Res. **69**: 454-495.

117- Ramirez, M. L., Chulze, S., and Magan, N. 2006. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. Int. J. Food Microbiol. **106**: 291-296.

118- Raspor, P., Mikli-Milek, D., Avbelj, M., and Cadez, N. **2010.** Biocontrol of grey mould disease on grape caused by *Botrytis cinerea* with autochthonous wine yeasts. Food Technol. Biotechnol. **48:** 336-343.

119- Reboux. G. 2006. Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. Revue française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique. **46**: 208-212.

120- Reid, T. C., Hausbeck, M. K., and Kizilkaya, K. **2002**. Use of fungicides and biological controls in the suppression of *Fusarium* crown and root rot of asparagus under greenhouse and growth chamber conditions. Plant Dis. **86**:493- 498.

121- Rini, C. R., and Sulochana, K. K. 2007. Usefulness of *Trichoderma* and *Pseudomonas* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* infecting tomato. J. Tropical Agricul. **45**: 21-28.

122- Rosini, G. 1983. The occurrence of killer characters in yeast. Can. J. Microbiol. **29**: 1462-1464.

123- Samapundo, S., Devlieghere, F., Meulenaer, B. D., Geeraerd, A. H., Impe, J. F. V., and Debevere, J. M. 2005. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticilliodes* and *F. proliferatum* on corn. Int. J. Food Microbiol. **105**: 35- 52.

124- Sansone, G., Rezza, I., Calvente, V., Benuzzi, D., and Sanz de Tosetti, M. I. 2005. Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. Postharvest Biol. Technol. **35**: 245-251.

125- Satyanarayana, T., and Kunze, G. 2009. Yeast biotechnology: diversity and applications. Springer. pp: 199-214.

126- Schubert, M., Fink, S., and Schwarze, W. M. R. F. 2008. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against wood decay fungi in urban trees. Biological Control. **45**: 111-123.

127- Shah, H. U., Simpson,T. J., Alam. S., Khattak, K. F., and Perveen, S. 2010. Mould incidence and mycotoxin contamination in maize kernels from Swat Valley, North West Frontier Province of Pakistan. Food Chem. Toxicol. **48:** 1111-1116.

128- Shanmugaiah, V., Balasubramanian, N., Gomathinayagam , S., Manoharan, P. T., and Rajendran, A. 2009. Effect of single application of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* on growth promotion in cotton plants. Afr. J. Agric. Res. **4**: 1220-1225.

129- Shephard, G. S., Marasas, W. F. O., and Leggott, N. L. 2000. Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. J. Agric. Food. Chem. **48**: 1860-1864.

130- Siameto, E. N., Okoth, S., Amugune, N. O., and Chege, N. C. 2010. Antagonism of *Trichoderma farzianum* isolates on soil borne plant pathogenic fungi from Embu District, Kenya. J. Yeast. Fungal Res. **1**: 47-54.

131- Sohail, M., Naseeb, S., Sherwani, S-k., Sultana, S., Aftab, S., Shahzad, S., Ahmad, A., and Khan, S-A. 2009. Distribution of hydrolytique enzyms among native fungi: *Aspergillus* the pre-dominant genus of hydrolase producer. Pak. J. Bot. **41**: 2567-2582.

132- Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., and Gullino, M. L. 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. Postharvest Biol. Technol. **24**:123-134.

133- Suruliranjan, M., and Sarbhoy, A. K. 2000. Effect of carbon and nitrogen sources on growth and sporulation of *Fusarium moniliforme.* J. Mycopathol. Res. **38**: 25-28.

134- Torres, M. R., Ramos, A. J., Soler, J., Sanchis, V., and Marin, S. 2003. SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus, Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. Int. J. Food Microbiol. **8**: 185-193.

135- Trigiano, R. N., Windham, M. T., and Windham, A. S. 2006. Plant pathology. concepts and laboratory exercises. pp: 144-145.

136- Tseng, T-C., Lee, K-L., Deng, T-S., Liu, C-Y., and Huang, J-W. **1995**. Production of fumonisins by *Fusarium* species of Taiwan. Mycopathologia. **130**: 117-121.

137- Velluti, A., Marin, S., Bettucci, L., Ramos, A. J., and Sanchis, V. 2000. The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B and zearalenone formation. Int. J. Food Microbiol. **59**: 59-66.

138- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R.Y., and Valero, J. R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control (Review). Biochem Engineering J. **37**: 1-20.

139- Vicent, C., and Corderre, D. 1992. La lutte biologique. TED & DOC. Lavoisier. pp: 12-15.

140- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra , R., Woo, S. L., and Lorito, M. **2008.** *Trichoderma*–plant–pathogen interactions (Review). Soil Biol. Biochem. **40**: 1-10.

141- Walker, G. M., McLeod, A. H., and Hodgson, V. J. 1995. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. FEMS. Microbiol. Lett. **127**:213-222.

142- Wei-wei, L., Bing-yu, Z. You-chen, D., and Feng, L. **2008**. Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. Agricultural Sciences in China. **7**: 1104-1114.

143- Whipps, J. M. **2001**. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany. **52**: 487-511.

144- Whipps, J. M. and Lumsdem, R. D. 1989. Biotechnology of fungi for improving plant growth. Cambridge University Press. pp: 173- 289.

145- Whipps, J. M., Sreenivasaprasad, S., Muthumeenakshi, S., Rogers, C.W. and Challen, M.P. 2008. Use of *Coniothyrium minitans* as a biocontrol agent and some molecular aspects of sclerotial mycoparasitism. Eur. J. Plant Pathol. **121**: 323-330

146- Widyastuti, S. **2008.** Physical Interactions between Yeast *Pichia guilliermondii* and Post-Harvest Fruit Pathogen *Penicillium expansum* . HAYATI Journal of Biosciences. **15**:27-31.

147- Wilson, C. L., and Wisniewski, M. E. **1989.** Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. Ann. Rev. Phytopathol. **27**: 425-441.

148- Wisniewski, M. E., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson C., and Chalutz, E. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. Physiol. Molecul. Plant Pathol. **39**: 245-258

149- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M., and Lorito, M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. Phytopathology. **96**: 181-185.

150- Yao, H., Tian, S., and Wang, Y. 2004. Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. Int. J. Food Microbiol. **93**: 297- 304.

151- Yiannikouris , A., and Jouany, J. P. **2002.** Mycotoxins in feeds and their fate in animals (Review). Anim. Res. **51**: 81-99.

152- Yoshikawa, M., Hashimoto ,N., and Yokoyama, T. **1994.** Crown rot of Asparagus coused by *Fusarium moniliforme* var. *intermedium.* Ann. Phytopath. Soc. Japan. **60**: 167-174.

153- Zainudin, N. A. I. M., Razak, A. A., and Salleh, B. 2008. Secondary metabolite profiles and mating populations of *Fusarium* species in section Liseola associated with bakanae disease of rice. Malaysian Journal of Microbiology. **4**: 6-13.

154- Zorzete, P., Castro, R. S., Pozzi, C. R., Israel, A. L. M., Fonseca, H., Yanaguibashi, G., and Correa, B. 2008. Relative populations and toxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in artificially inoculated corn at various stages of development under field conditions. J. Sci. Food Agric. **88**: 48-55.

مقدمة:

تتعرض الحبوب للتلوث بالفطريات منذ تواجدها بالحقل وحتى أثناء التخزين، حيث تتسبب في خسائر تقدر بـ 5-10% (Pfohl-leszkowicz، 2001). وتتمثل هذه الفطريات أساسا في *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium*، والتي يؤدي تواجدها على الحبوب المخزنة إلى انخفاض نسبة إنبات الحبوب، و تغير اللون، نقص الوزن، التعفن، بالإضافة إلى إمكانية إفراز سموم مختلفة تتسبب في حدوث أمراض خطيرة لكل من الإنسان والحيوان (Christensen و Kaufmann، 1969). ويعتبر المحتوى الرطوبي للبذور ودرجة الحرارة وفترة التخزين من أهم العوامل التي تؤثر على إصابة البذور بفطريات التخزين.

تعتبر الذرة (*Zea mays*) من أهم المحاصيل الزراعية في العالم، حيث تمثل الغذاء الأساسي للعديد من دول جنوب أسيا كالهند وباكستان وأمريكا اللاتينية، وبعض الدول الإفريقية. في الجزائر تستعمل كأعلاف للمواشي والدواجن وأغلبها مستوردة. وكغيرها من الحبوب فهي تتلوث بالعديد من الفطريات، مما يستوجب إيجاد طرق للحد من انتشارها، خصوصا المفرزة للسموم، وذلك بمكافحتها كيميائيا باستعمال المبيدات الكيميائية، والتي ينتج عن استعمالها الكبير وغير المنتظم ظهور سلالات مقاومة، وأضرار صحية. وقد توجهت العديد من الدراسات إلى المكافحة البيولوجية كطريقة بديلة باستعمال كائنات حية دقيقة مضادة (البكتيريا و الفطريات و الخمائر)، وذلك لما لها من ايجابيات لكونها غير ملوثة للبيئة، و غير مكلفة.

تهدف هذه الدراسة إلى عزل و تشخيص الفطريات الملوثة لبذور الذرة، ودراسة العوامل المؤثرة على نمو الفطر السائد *Fusarium moniliforme*. والعمل على مكافحته بيولوجيا باستعمال فطر *Trichoderma harzianum* و خميرة *Debaryomyces hansenii*.

الملحـق

ملحق (1): الأوساط الزراعية المستعملة في الدراسة

1- وسط مستخلص البطاطا Potato Dextrose Agar (PDA):

لتحضير هذا الوسط يتم غسل وتقطيع 200 غ بطاطا، وتضاف إلى 700ملل من الماء المقطر، وتغلى لمدة 20 د، ثم ترشح ويضاف إلى هذه الرشاحة 20 غ غلوكوز، 15 غ أجار، والماء المقطر إلى غاية الحصول على 1000ملل.

2- وسط Dextrose Potato Broth :

لتحضير هذا الوسط يتم غسل وتقطيع 200 غ بطاطا، وتضاف إلى 700ملل من الماء المقطر، وتغلى لمدة 20 د، ثم ترشح ويضاف إلى هذه الرشاحة 20 غ غلوكوز، ثم يضاف الماء المقطر إلى غاية الحصول على 1000ملل.

3- وسط Malt Extract Agar (MEA):

- مستخلص المالت.....20 غ
- بيبتون.....1 غ
- غلوكوز.....20 غ
- أجار.....15 غ
- ماء مقطر.....1000 ملل

4- وسط Yeast Extract Sucrose Agar (YESA) :

- مستخلص الخميرة.....20 غ
- $MgSO_4,7H2O$.....0.5 غ
- سكروز .....150 غ
- أجار.....15 غ
- Trace metal 1ملل
- ماء مقطر.....1000ملل

- **Trace metal**:

- $ZnSO_4,7H_2O$ .....1 غ
- $CuSO_4,7H_2O$ ..... 0.5 غ
- ماء مقطر..... 100ملل .

5 - وسط Czapek:

- $Na\ NO_3$ .....2 غ
- KH_2PO_4 .....1 غ

- $Mg\ SO_4.7H_2O$.....1 غ
- KCl ..... 0.5 غ
- $FeSO_4.7H_2O$ ..... 0.01 غ
- سكروز.....30 غ
- أجار.....15 غ
- ماء مقطر.....1000 ملل

يضاف لكل 1 ل من المحلول 1 ملل من المحاليل التالية (0.01 غ من $Zn\ SO_4.7H_2O$ في 100 ملل من الماء المقطر و $CuSO_4.7H_2O$ بمقدار 0.01 غ في 100 ملل ماء مقطر) على أن تسخن هذه المحاليل لمدة ربع ساعة في حمام مائي، ثم يعقم الوسط على درجة 121°م لمدة 20 دقيقة.

6- وسط Saboraud:

- بيبتون.....10 غ
- غلوكوز.....40 غ
- أجار.....20 غ
- ماء مقطر.....1000ملل

7- الوسط الأساسي Base medium:

- K_2HPO_4.....1 غ
- $MgSO_4,7H_2O$.....0.5 غ
- KCl.....0.5 غ
- $FeSO_4,7H_2$ ..... 0.01 غ
- Asparagin.....1.7 غ
- غلوكوز.....1 غ
- أجار.....20 غ
- ماء مقطر.....1000ملل

8 - وسط Nitrat Agar 25% glycerol (G25N):

- K_2HPO_4.....0.75 غ
- مركز Czapek.....7.5ملل
- مستخلص الخميرة.....3.7 غ
- غليسيرول ..... 250 غ
- أجار.....12 غ

- ماء مقطر.....1000ملل

مركز Czapek:

- $NaNO_3$.....3غ
- KCl.....0.5غ
- $MgSO_4,7H_2O$.....0.5غ
- $FeSO_4,7H_2O$.....0.01غ

9 – وسط Czapek Yeast extract Agar (CYA):

- K_2HPO_4.....1غ
- مستخلص الخميرة.....5غ
- سكروز.....30غ
- أجار.....15غ
- مركز Czapek.....10ملل
- ماء مقطر.....1000 ملل

10– وسط Yeast Extract Dextrose Peptone (YPD):

- مستخلص الخميرة.....5غ
- ببتون..... 10غ
- غلوكوز.....20غ
- ماء مقطر.....1000ملل

11– وسط Nutrient Yeast Extract Dextrose Agar (NYDA) :

- مرق مغذي 10ملل
- مستخلص الخميرة.....5غ
- غلوكوز.....20غ
- أجار.....15غ
- ماء مقطر.....1000ملل

مرق مغذي:

- مستخلص الخميرة.....2غ
- ببتون.....10غ
- NaCl. 5غ
- ماء مقطر.....1000ملل.

ملحق 2: التحليل الإحصائي:

في كل الحالات التالية: المتوسطات التي تنتمي لنفس المجموعة لا يوجد فرق معنوي بينها.

1- تأثير درجة الحرارة على نمو الفطر (n =3 ، p<0.5):

درجات الحرارة °م	متوسط النمو القطري (ملم)	المجموعات
05	0 ± 07	G
10	1 ± 11	F
15	0 ± 45	D
20	0 ± 68	C
25	0 ± 90	A
30	1.15 ± 81	B
35	0 ± 25	E
40	0 ± 07	G

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Corrected total	23	24711.95833	-	-	-
Temperature	7	24707.29167	3529.61310	12101.5	p<.0001
Error	16	4.66667	0.29167	-	-

2- تأثير الأوساط على نمو الفطر (n =3 ، p<0.5):

أوساط الزرع	متوسط النمو القطري (ملم)	المجموعات
MEA	0 ± 75	C
PDA	0 ± 90	A
YESA	0 ± 80	B
Sabouraud	1 ± 60	D
Czapek	0 ± 25	E

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Corrected total	14	7712.000000	-	-	-
Media	4	7710.000000	1927.500000	9637.50	p<.0001
Error	10	2.000000	0.200000	-	-

3- تأثير درجة الأس الهيدروجيني (pH)، (n =3 ، p<0.5):

درجات الأس الهيدروجيني	متوسط الوزن الجاف للمسليوم (مغ)	المجموعات
4	0.011 ± 0.22	C
5	0.033 ± 0.49	A
6	0.033 ± 0.29	B
7	0.015 ± 0.26	B
8	0.011 ± 0.22	C
9	0.011 ± 0.02	D

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Corrected total	17	0.32364444	-	-	-
pH	5	0.31737778	0.06347556	121.55	p<.0001
Error	12	0.00626667	0.00052222	-	-

4- تأثير الرطوبة النسبية على نمو الفطر (RH%)، (n =3 ، p<0.5):

الرطبة النسبية (RH%)	متوسط النمو القطري (ملم)	المجموعات
80	0 ± 60	D
85	0.57 ±67.33	C
90	0 ± 80	B
95	0.57 ± 87.66	A

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Corrected total	11	1390.250000	-	-	-
RH	3	1388.916667	0.06347556	2777.83	p<.0001
Error	8	1.3333333	0.166667	-	-

5- تأثير مصدر الكربون على نمو الفطر ،(n =3 ، p<0.5):

مصدر الكربون	متوسط النمو القطري (ملم)	المجموعات
الغلوكرز	0 ± 90	A
السكروز	1 ±80.33	B
النشاء	0 ± 80	C
حمض الستريك	0 ± 34	D

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Corrected total	11	5860.250000	-	-	-
Carbon source	3	5858.250000	1952.750000	7811.00	p<.0001
Error	8	2.000000	0.250000	-	-

6- تأثير مصدر الآزوت (n =3 ، p<0.5):

مصدر الأزوت	متوسط النمو القطري (ملم)	المجموعات
KNO3	0 ± 80	A
NH_4Cl	1 ±75	B
Glycine	5.5 ± 61.33	D
Peptone	0.5 ± 67.33	C

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Corrected total	11	672.9166667	-	-	-
Nitrogen source	3	611.5833333	203.8611111	26.59	p<.0001
Error	8	61.3333333	7.6666667	-	-

المناقشة:

تنمو الذرة في جميع أنحاء العالم، وهي تلعب دورا مهما في التغذية، خصوصا في الدول الإفريقية. وكغيرها من الحبوب فإنها تتعرض للتلوث بالفطريات منذ تواجدها في الحقل وكذلك أثناء التخزين. حيث أنه عند تخزينها في ظروف سيئة فإن مجموعة من الفطريات التي تنتمي أساسا إلى *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* تتسبب في العديد من الأضرار، كالتأثير على القيمة الغذائية، وانخفاض نسبة الإنبات والتعفن، بالإضافة إلى إمكانية إفراز سموم مختلفة تتسبب في أمراض خطيرة لكل من الإنسان والحيوان. ويعتبر المحتوى الرطوبي للبذور ودرجة الحرارة وفترة التخزين من العوامل الرئيسية التي تؤثر على إصابة البذور بفطريات لتخزين.

عند قياس الرطوبة النسبية للعينتين لوحظ أنه يوجد اختلاف بينهما، حيث أن الرطوبة النسبية للعينة المجلوبة من الجزائر العاصمة أكبر من مثيلتها المأخوذة من ولاية سطيف. وقد يعود هذا الاختلاف فيما بينهما إلى اختلاف مصدر العينتين وكذلك ظروف النقل و التخزين، وعلى العموم فإن الرطوبة النسبية لكلتا العينتين أقل من 15%، وهي نسبة مقبولة (Kaaya و Kyamuhangire 2006 ؛ Alam وآخرون 2007). ومن خلال نتائج العزل والتشخيص وجد أن هناك اختلاف في عدد الفطريات المعزولة سواء الداخلية أو الخارجية، حيث كانت العينة الثانية أكثر تلوثا (4.03×10^4 CFU/غ) مقارنة بالأولى (1.23×10^3 CFU/غ). وبالرغم من أن الرطوبة النسبية أقل من 15% فإن العينتين ملوثتين، وقد يعود هذا إلى عوامل مختلفة مثل الحرارة والنشاطية المائية وهيئة وظروف ومدة التخزين، والتي تساعد على نمو الفطريات أثناء التخزين (Hell وآخرون، 2000؛ Alam و آخرون، 2009). كما قد يعود السبب إلى تلوث هذه البذور في الحقل لأن ذلك يزيد من تلوثها أثناء التخزين (Hell وآخرون،2003). هذه النتائج مشابهة لما وجده Shah وآخرون (2010) حيث قدر التلوث الفطري بـ 8.32 - 18.62×10^3 CFU/غ من الذرة (باكستان). ويعتبر العدد 10^4CFU/غ الحد الأقصى المسموح به في القمح وعند

الأخذ بعين الاعتبار هذا المقياس فإن العينة الثانية تعتبر ملوثة وتوحي بالخطر (Berghofe وآخرون، 2002). لقد تم عزل مجموعة من الفطريات أهمها *Fusarium* و *Aspergillus* و *Penicillium* بنسب مختلفة، ففي العينة الأولى كانت السيادة لجنس *Fusarium* سواء داخليا أو سطحيا ، بنسبة 58.74% و 54.25% على الترتيب، في حين كان فطر *Aspergillus* هو السائد في العينة الثانية (53.43% داخليا و 40% سطحيا). هذه النتائج موافقة لما تحصل عليها Khosravi وآخرون (2007) في دراستهم للفطريات الملوثة للذرة المحلية (إيران)، و المستوردة من البرازيل والصين، حيث كانت السيادة للأجناس الثلاث السابقة الذكر لكن بنسب متفاوتة. كما وجد أن فطر *Fusarium* هو الفطر السائد في كل من الذرة والشعير والقمح، وكان النوع *F. moniliforme* هو الأكثر ظهورا من بين أجناس هذا الفطر (Aziz و آخرون، 2007). حيث أن هذا الفطر يعتبر أكثر الفطريات تلويثا للذرة على وجه الخصوص (Nilson، 1992). تعتبر الأجناس السالفة الذكر أهم الفطريات الملوثة للحبوب، و خصوصا الذرة (Shephard وآخرون، 2000؛ Fandohan وآخرون، 2005). كما أن وجود فطر *Aspergillus* وبنسبة كبيرة إلى جانب فطر *Penicillium* يمكن أن يفسر بأنهما من فطريات التخزين. كذلك قد يفسر وجود فطر *Fusarium* بنسبة كبيرة بالرغم من أنه يعتبر من فطريات الحقل، بقائه بعد أشهر من التخزين (Nakai وآخرون، 2008).

تعتبر العوامل الفيزيوكيميائية مثل درجة الحرارة والرطوبة النسبية والمواد الغذائية ودرجة الحموضة، من أهم العوامل المؤثرة على نمو الفطريات وانتشارها وكذلك إنتاجها للسموم الفطرية.

عند اختبار تأثير درجة الحرارة على نمو فطر *F. moniliforme* على وسط PDA وجد أن هذا الفطر ينمو في المجال 10-35°م، وينعدم النمو عند 5°م و 40°م مع نمو جيد في المجال 25 - 30°م ودرجة مثلى 25°م. وقد يعود تغير النمو إلى تأثر عمل الإنزيمات بتغير الحرارة. هذه النتائج مماثلة لما وجده Yoshikawa وآخرون (1994)،

حيث نمى الفطر على وسط PDA. كما بينت العديد من الدراسات أن هذا الفطر ينمو جيدا في المجال 25 - 30°م، بالإضافة إلى أنواع أخرى تابعة لهذا الجنس مثل *F. graminearum*،*F. solani* و *F. proliferatum* (Alberts وآخرون، 1990؛ Velluti وآخرون، 2000؛ Kausar وآخرون، 2009؛ Mogensen آخرون، 2009).

بالنسبة لتأثير الرطوبة النسبية فقد لوحظ تغير نمو الفطر بتغيرها، حيث كان نموه ضعيفا عند RH = 85 %، ثم يزداد النمو كلما ارتفعت الرطوبة النسبية، وهذا موافق لما تحصل عليه Marin وآخرون (1995) و Samapundo وآخرون (2005)، حيث وجد هذا الأخير أن نمو الفطر يزداد بازدياد النشاطية المائية في درجات حرارة مختلفة (15، 20، 25، 30°م). وقدرت النشاطية المائية الأدنى للنمو بـ 0.869، في حين انعدم النمو عند (a_w =0.831)، وكان مثاليا عند النشاطية المائية 0.976. ولذلك يمكن القول أن درجة الحرارة والنشاطية المائية يعتبران من أهم العوامل الأساسية المؤثرة على نمو الفطريات، بدءا بتحفيز انتاش الأبواغ إلى النمو الجيد للفطر. من خلال هذه النتائج يمكن تفسير إصابة الذرة بفطر *F. moniliforme*، حيث أن هذا النبات ينمو في المجال الحراري 20 - 30°م منذ فترة الإزهار إلى غاية الحصاد، كما تكون النشاطية المائية ملائمة لنموه (0.87 - 0.98)، إذ أن هذا الفطر يصيب تقريبا معظم أجزاء هذا النبات من جذور وسيقان و حتى السنابل (Fandohan وآخرون، 2003؛ Zorzete و آخرون، 2008؛ و آخرون، Menniti، 2010).

وجد أن نمو الفطر يتأثر جدا بتغير درجة الأس الهيدروجيني، حيث كان النمو مثاليا عند pH = 5، ثم ينخفض النمو كلما ارتفعت درجة الأس الهيدروجيني. هذه النتائج موافقة لما وجده كل من Boonyapranai وآخرون (2008) و Al- kadeeb (2004) عند تنميتهم للفطر على وسط PDB . في حين بين Marin وآخرون (1995) أن نمو الفطر يكون مثاليا عند pH = 7، و الدرجة 30°م، و نشاطية مائية 0.92 على وسط Maize extract agar. بينت العديد من الدراسات أن نمو الفطريات يتأثر بتغير درجة حموضة الوسط، حيث يمكنها أن

تؤثر على وظائف الغشاء الخلوي و ذوبان الأملاح، بالإضافة إلى امتصاص الأغذية والبناء الخلوي (Chen و Jonhs، 1993؛ Bekada وآخرون، 2008). كما يمكنها أن تؤثر على عمل الإنزيمات (Al- kadeeb، 2004 ؛ Boonyapranai وآخرون، 2008).

عند دراسة تأثير الأوساط على نمو *F. moniliforme* وجد أنه ينمو على كل الأوساط المختبرة، مع وجود اختلاف في لون وقطر المستعمرة. وكان PDA هو الوسط الأمثل لنمو الفطر مقارنة مع باقي الأوساط، تميز فيه الفطر بنمو سريع و مسليوم كثيف. حيث وجد أن هذا الوسط جيد لنمو وتبوغ العديد من الفطريات مثل: *F. solani* و *Lasiodiplodia theobromae* و *Embellisia allii* (Kausar وآخرون، 2009؛ Lee و Magan، 2010). في حين وجد Boonyapranai وآخرون (2008) أن وسط Malt extract broth هو الأفضل للنمو مقارنة بالأوساط Peptone glycerol broth و Sabouraud broth و Yeast extract malt extract broth. وقد يعود هذا إلى اختلاف العزلات من منطقة لأخرى، بالإضافة إلى اختلاف الظروف التجريبية. يعتبر وسط PDA وسطا ملائما لنمو العديد من الفطريات حيث يستعمل للعزل والتشخيص خصوصا لجنس *Fusarium*، الذي يظهر فيه الفطر نموا جيدا و تنوعا كبيرا في مظهر المستعمرة و الأبواغ (Pitt و Hocking ، 1985). حيث يتميز هذا الوسط بغناه بالعديد من العناصر الضرورية لنمو الفطريات فهو غني بالغلوكوز (20غ/ل) والنشاء و والبروتينات بالاضافة إلى الفيتامينات B1، B2، B3 والأحماض الآمنية (حمض الغلوتاميك والأسبارتيك والليزين)، والتي تعتبر مصدرا مهما للنتروجين، بالإضافة إلى احتواءه على مجموعة من المعادن كالكالسيوم والبوتاسيوم والصوديوم. لوحظ أيضا نمو الفطر على أوساط الزرع الأخرى YESA و MEA و Sabouraud، وذلك لغنى هذه الأوساط بمصادر الكربون والنتروجين. أما بخصوص وسط Czapek ذو التركيبة الغنية بالأملاح المعدنية، فكان النمو به ضعيفا جدا، وقد يعود هذا إلى التركيبة الفقيرة إلى المواد الغذائية الأساسية التي يحتاجها الفطر لنموه.

أظهرت نتائج اختبار تأثير مصدري الكربون والنتروجين على نمو *F. moniliforme*، أن هذا الفطر ينمو في وجود مصادر مختلفة من الكربون والنتروجين لكن النمو يتأثر بتغيرها. وقد وجد أن الغلوكوز هو مصدر الكربون الأمثل للنمو، يليه السليلوز ثم النشاء ثم السكروز وأخيرا حمض الستريك. هذه النتائج مشابهة لما وجده كل من Suruliranjan و Sarbhoy (2000)، و Bluhm و Woloshuk (2005)، و Al-Kadeeb (2004). الذين وجدوا أن الغلوكوز هو الأفضل لنمو *F. moniliforme*. حيث تستعمل السكريات من طرف الفطريات في انتاش الأبواغ والنمو. كما أن الغلوكوز يدخل في البناء الحيوي العديد من المستقلبات الثانوية، وذلك عن طريق فسفرته حيث يعتبر المستقلب الرئيسي للغليكوليز (Griffin، 1976؛ Demain، 1986).في حين وجد Boonyapranai وآخرون (2008)، أن هذا الفطر ينمو جيدا في وجود المالتوز مقارنة بالسكروز والغلوكوز. وقد بين Blesa وآخرون (2009) في دراسته أن وجود الغلوكوز في الوسط يحفز إنتاج سم T-2 toxin من طرف *F. sporotrichioides*. نمو الفطر في وجود السكروز يدل على أنه يفرز إنزيم Saccharase. كما يفسر نموه وجود النشاء والسليلوز بإفراز هذا الفطر لإنزيمي Amylase و Cellulase، خصوصا وأنه ثبت في دراسات سابقة أنه يفرز هذين الإنزيمين (Figueira و Hirooka، 2000؛ Bluhm و Woloshuk، 2005). كما توجد أنواع أخرى تابعة لهذا الجنس لها القدرة على إنتاج هذا الإنزيم مثل *F. oxysporum* (Sohail وآخرون، 2009؛ Ramanathan وآخرون، 2010).

بالنسبة لتأثير مصادر النتروجين على نمو *F. moniliforme*، فقد لوحظ أنه ينمو في وجود مصادر مختلفة من النتروجين، حيث وجد أن نترات البوتاسيوم هو المصدر الآزوتي الأمثل للنمو يليه الغليسين ثم الببتون. وهي نتيجة مماثلة لما وجده El-Bahrawi (1977)، حيث وجد أن الفطر ينمو في وجود المصادر غير العضوية للنتروجين (نترات الأمونيوم وكبريتات الأمونيوم) بصفة أفضل مقارنة بوجود المصادر العضوية (مستخلص الخميرة و الصويا). في حين وجد في دراسات أخرى أنه ينمو أفضل في وجود الآزوت العضوي (Suruliranjan و Sarbhoy، 2000؛

Boonyapranai وآخرون، 2008). يعتبر النتروجين عنصرا مهما لنمو الفطريات، حيث يدخل في البناء الحيوي للمستقلبات الثانوية و الصبغات (Jung و آخرون، 2003؛ Boonyapranai وآخرون، 2008). كما أن مصادر النتروجين تؤثر على البناء الحيوي للبروتينات. و قد وجد أيضا أن النتروجين (NO^-_3 و NH^+_4) و الأملاح المحتوية على أيون الزنك ضرورية لبناء السّمين الفطريين Naphthazarins و Fusaric acid عند جنس *Fusarium* (Duarte وArcher ،2003). وقد يفسر نمو الفطر في وجود البيتون بقدرته على إنتاج الإنزيمات المحللة للبيتون إلى أحماض أمنية ضرورية للنمو.

يشمل جنس *Fusarium* العديد من الأنواع المفرزة للسموم الفطرية، سوءا عند نموها على الأوساط الطبيعية (الحبوب)، أو على أوساط الزرع المختلفة. ويخضع ذلك لظروف معينة كالتركيب الكمي والنوعي للوسط، ودرجة الحرارة والأس الهيدروجيني. فعند تنمية فطر *F. moniliforme* على وسط PDB، والذي يعتبر الوسط الأمثل للنمو، لوحظ أنه يفرز مجموعة من المستقلبات الثانوية لم يتم التعرف عليها جميعا، ولكن بالاعتماد على مقارنة معامل الانسياب و الملاحظة تحت الأشعة فوق البنفسجية مع ما وجده كل من Tseng وآخرون (1995) و Zainudin وآخرون (2008)، فيعتقد أن البقعة ذات Rf = 0.64 واللون البنفسجي المحمر قد تكون Fumonisin، ويعتبر *F. moniliforme* و *F. proliferatum* ، النوعين الأكثر إنتاجا لهذا السم الفطري. لكن أشارت بعض الدراسات إلى وجود أنواع أخرى تابعة لهذا الجنس لها القدرة على إنتاج Fumonisin، وهي *F. anthophilium* ، *F. dlamini* ، و*F. napiforme* (Nelson وآخرون، 1992؛ Chelkowski و Lew، 1992). بالإضافة إلى أجناس أخرى مثل *Alternaria alternata* (Chen، 1992) و *A. niger* (Mogensen وآخرون، 2009). كما وجد أيضا أن *F. moniliforme* ينتج سم T_2-toxin، وهو من أنواع Trichothecenes، و الذي ينتج من طرف هذا النوع (Chakrabarti و Ghosal، 1986؛ Kollu وآخرون، 2009؛ Li وآخرون، 2009).

بالإضافة إلى أنواع أخرى تابعة لهذا الجنس وخصوصا *F. sporotrichioides* و *F. poae* (Jouany وأخرون، 2009).

الفطريات كائنات واسعة الانتشار، بعضها تؤثر ايجابيا على النبات، على عكس البعض الآخر منها، والتي تتسبب في حدوث أمراض تؤدي إلى نقص الإنتاج. مما يستوجب البحث عن طرق وسبل لخفض حدة الأمراض و القضاء عليها إن أمكن. وتعد المكافحة البيولوجية من أهم الوسائل المستعملة للقضاء على العوامل الممرضة، و قد يكون ذلك باستعمال البكتيريا أوالفطريات أو الخمائر.

أظهر فطر *T. harzianum* تثبيطا كبيرا للفطر *F. moniliforme* عند زراعتهما على نفس الطبق. حيث قدرت نسبة التثبيط بـ 75%، وذلك لقدرته التنافسية العالية على المكان والغذاء. حيث انتشر على سطح الوسط بسرعة أكبر مقارنة بـ *F. moniliforme* . وهذا موافق للعديد من النتائج، التي أظهرت أن لهذا الفطر القدرة على تثبيط العديد من الفطريات التي تنتمي لجنس *Fusarium* مثل: *F. moniliforme* و *F. graminearum* و *F. oxysporum* (Dubey وآخرون، 2007؛ El-Hasan وآخرون، 2007؛ Siameto وآخرون، 2010)، وفطريات أخرى مثل: *Rhizoctonia solani*، *Pythium* sp، *A. parasiticus*، *A. flavus* (Emma وآخرون، 2008؛ Siameto وآخرون، 2010). إن لفطر *Trichoderma* القدرة على إفراز مجموعة من الإنزيمات المحللة مثل: Lipase، Cellulase ، Amylase، Pectinase، Chitinase والتي تعمل على تثبيط نمو الفطر الممرض وانتاش الأبواغ، (Benítez و آخرون، 2004)، وبالأخصß-glucanase، Chitinase ، Cellulase والتي تعمل على تفكيك الجدار الخلوي للفطر الممرض (Emma وآخرون، 2008).

عند دراسة تأثير رشاحة فطر *T. harzianum* على نمو *F. moniliforme*، لوحظ نمو منخفض للفطر ومسليوم رفيع مقارنة بالشاهد. و يدل هذا على أن الفطر يفرز مجموعة من المواد، والتي لها القدرة على تثبيط نمو الفطر. وهذا ما وجد عند فصل المستقلبات الثانوية لفطر *T. harzianum* بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة،

حيث تمت ملاحظة 5 بقع تحت الأشعة فوق البنفسجية، التي قد تكون عبارة عن مضادات حيوية. لقد وجد Siameto وآخرون (2010)، أن رشاحة هذا الفطر لها القدرة على تثبيط نمو كل من *R. solani*، *Pythium* sp ، *F. graminearum*، و *F. moniliforme* . حيث وجد أن *T. harzianum* يفرز مجموعة من المضادات الحيوية: Butenolide harzianolide، Pyridone harzianopyridone، Trichorzianines، و Viridiofungin A (Emma وآخرون، 2008؛ El-Hasan وآخرون، 2009).

عند دراسة تأثير المواد الطيارة، وجد أن *T. harzianum* يفرز مجموعة من المواد الطيارة لها القدرة على تثبيط نمو الفطر، حيث قدرت نسبة التثبيط بـ 43.33 %. والتي تعمل على منع انتاش الأبواغ واستطالة الهيفا. هذه النتائج موافقة لما وجده كل من El-Hasan وآخرون (2007) و Hajieghrari وآخرون (2008)، عندما درسوا تأثير المواد الطيارة على نمو مجموعة من الفطريات (*F. moniliforme*، *Macrophomina phaseoli*، *Phytophtora cactorum*، *F. graminearum*، *R. solani*). حيث وجد أن هذا الفطر يفرز مجموعة من المواد الطيارة أهمها 6-pentyl-α-pyrone والذي ثبط نمو العديد من الفطريات منها: *Botrytis cinerea*، *R. solani*، *Pythium ultimum* (Emma وآخرون، 2008). وجد أيضا أن أنواع أخرى تابعة لجنس *Trichoderma* تفرز مجموعة من المواد الطيارة، كما هو الحال عند *T. viride* و *T. pseudokoningii* و *T. atroviride*، ومن بين هذه المواد 2-ethylcyclopentanone و a-trans-bergamotene و 6-pentyl-2-pyrone (Rini و Sulochana، 2007؛ Polizzi وآخرون، 2011).

يعتبرالتطفل الفطري من آليات المكافحة لدى *T. harzianum* ، وذلك من خلال الالتفاف حول هيفا الفطر المستهدف. وقد ظهر هذا عند ملاحظة منطقة تلاقي الفطرين بالمجهر الضوئي. و قد أرجع Bertagnolli و آخرون (1998) تعرف هيفات *T. harzianum* على الفطر الممرض (*R. solani*)، إلى احتواء الفطر الممرض

على الكيتين في جداره الخلوي، الأمر الذي يسهل التصاق الفطر المضاد به. كما أظهر Schubert وآخرون (2008) هذا بالمجهر الالكتروني، حيث لاحظوا أن فطر *Trichoderma* يكون ممصات تمكنه من الالتصاق بمسليوم الفطر العائل، ومع إفراز الإنزيمات المحللة، يتحلل الجدار الخلوي للعائل ويتسرب السيتوبلازم.

استعملت الخمائر في انتاج الكحولات والإنزيمات، وفي السنوات الأخيرة استعملها العديد من االباحثين في المكافحة البيولوجية، سواء على النبات و الفواكه أو أثناء تخزين الحبوب. وذلك لما لها من قدرة كبيرة على التطفل خصوصا على الفطريات. من أهم الخمائر المستعملة في المكافحة البيولوجية للفطريات *P. anomala* و *S. cerevisiae* و *D. hansenii* . هذه الأخيرة اختبرت في مدى قدرتها على تثبيط الفطر *F. moniliforme* بطريقتين مختلفتين، حيث وجد أنها تثبط نمو الفطر بنسبة 32.3% حسب طريقة Raspor وآخرون (2009)، و 51% حسب طريقة Elwakil وآخرون (2010). درس El-Mehalawy (2004) تأثير خميرتين عزلهما من جذور نبات اللوبيا، وهما *S. unispora* و *C. steatolytica* على نمو *F. oxysporum* فوجد أنهما تثبطان نمو الفطر بنسبة 65 و70% على الترتيب. بينت العديد من الدراسات قدرة *D. hansenii* على تثبيط نمو العديد من الفطريات مثل: *Aspergillus* sp، *Byssochlamys fulva*، *B. nivea*، *Cladosporium* sp، *Eurotium chevalieri*، و *Penicillium candidum* (Liu و Tsao، 2009). وقد لوحظ توقف نمو الفطر في الجهة المقابلة لـ *D. hansenii* دون وجود احتكاك فيزيائي بينهما، وهذا يدل على أن هذه الخميرة تنتج مجموعة من المواد الحيوية التي تثبط نمو الفطر. قد تكون عبارة عن مضادات حيوية أو إنزيمات محللة أو سموم قاتلة. حيث وجد أن *D. hansenii* تنتج السموم القاتلة (Hernández وآخرون، 2008؛ Marquina وآخرون، 2001). إذ أن هذه السموم القاتلة تؤثر على الغشاء الخلوي، وذلك بتشكيل قنوات عبره مما يتسبب في تسرب الأيونات، و توقيف الانقسام الخلوي (Chi وآخرون، 2010). كما وجد أن هذه الخميرة تنتج إنزيمات محللة للجدار الخلوي مثل Exo -ß-glucanase (1,3)، و Proteases (Bolumar وآخرون،2005 ؛ Bolumar وآخرون، 2008). وقد أثبت

Hernandez-Montiel وآخرون (2010)، أن هذه الخميرة تثبط انتاش أبواغ *P. italicum* بنسبة 70%، وأرجعوا ذلك إلى التنافس على المكان والغذاء وإنتاج الإنزيمات المحللة.

عند اختبار تأثير المواد الطيارة المفرزة من طرف *D. hansenii* وجد أنها تثبيط نمو *F. moniliforme* بنسبة بـ 58.33%. وقد قام Andrade وآخرون (2010) بدراسة المواد الطيارة التي تفرزها هذه الخميرة، ووجدوا أنها تنتج العديد من المواد الطيارة، من بينها Propanoic acid، 3-Methylpentane ، Acetic acid Ethyl ester، Ethanol، Chloroform، و Methylbenzene.

وجد في دراسات سابقة أن إضافة بعض الخمائر التي لها القدرة على تثبيط الفطريات مخبريا يمكن استغلالها في تخزين الحبوب تحت ظروف السد المحكم. ومن أهمها *P. anomala* التي ثبطت نمو كل من *P. roqueforti* و *P. verrucosum* (Druvefors وآخرون، 2005؛ Mokiou و Magan، 2008). في هذه الدراسة وجد أن *D. hansenii* لها القدرة على تثبيط نمو *F. moniliforme* في المخازن المصغرة (*mini silos*)، حيث صنفت درجة التأثير بـ «تثبيط» (++). وقد يعود هذا إلى حدوث تنافس فيما بينهما على المكان والغذاء، والتطفل، وإفراز الإنزيمات المحللة والمواد الطيارة، وخصوصا في هذه الحالة، لأن المخازن تكون محكمة السد. قام Druvefors وآخرون (2005)، بدراسة تأثير 58 خميرة على نمو *P. roqueforti* في المخازن المصغرة، فوجد أن بعضا منها لم تحدث أي تثبيط، والبعض الآخر تثبيطا ضعيفا، وأخرى أعطت تثبيطا جيدا و منها: *P. anomala* و *C. pelliculosa*. لكن *D. hansenii* أعطت تثبيطا ضعيفا، على عكس ما تم التوصل إليه في هذه الدراسة في مكافحة *F. moniliforme*. وقد يعود هذا إلى اختلاف الفطرين و الظروف التجريبية وحتى اختلاف عزلات الخميرة المستعملة. وقد تكون هذه المرة الأولى التي تستعمل فيها *D. hansenii* في تثبيط *F. moniliforme* سواء على الطبق أو في المخازن المصغرة. حيث أعطت تثبيطا جيدا، مما يفسح المجال لاستغلال هذه النتائج

وتطبيقها على أرض الواقع، وبالتالي الحد من نمو الفطريات على البذور أثناء التخزين، والذي يشكل خطرا كبيرا خصوصا وأن هذه الفطريات تنتج سمومما مضرة.

1- جلب العينات:

أخذت عينتين من الذرة، الأولى من ولاية سطيف بصفتها ولاية داخلية، والثانية من ولاية الجزائر العاصمة كولاية ساحلية. وقد تم جلبهما من السوق (الموجهة للاستهلاك)، حيث وضعت في أكياس معقمة وأخذت مباشرة إلى المخبر.

2- قياس الرطوبة النسبية:

تم قياس الرطوبة النسبية للعينتين بعد جلبهما مباشرة إلى المخبر، وذلك حسب طريقة Essono وآخرون(2007)، حيث تم حساب الفرق في الوزن لكلتا العينتين قبل وبعد تجفيف 100غ من الذرة، وذلك بتجفيفها في الفرن في درجة حرارة 60°م لمدة 72 ساعة حسب العلاقة التالية:

$$MC = [(Wi - Wf) / Wi] \times 100$$

MC: المحتوى المائي.

Wi: الوزن الابتدائي.

Wf: الوزن النهائي.

3- عزل الفطريات الداخلية والخارجية للذرة:

3-1- عزل الفطريات الداخلية:

تم عزل الفطريات الداخلية لكل عينة بتعقيم 10غ من الذرة سطحيا، وذلك بغمرها في محلول هيبوكلوريدات الصوديوم (NaOCl) لمدة دقيقتين، ثم غسلها ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم. بعدها تجفف بورق Watman 1 N° المعقم، ثم توضع على وسط PDA بمعدل خمس حبات ذرة في كل طبق. تحضن الأطباق في درجة حرارة

25°م لمدة أسبوع، و نقيت العزلات بالاعتماد على طريقة الزرع المتكرر على الأطباق (Amadi وآخرون، 2009).

3-2- عزل الفطريات الخارجية:

بغرض عزل الفطريات الخارجية تم إضافة 15 غ من الذرة إلى 150مل من الماء المقطر المضاف له Tween 80 (0.05%)، ترج الحوجلة جيدا بجهاز الرج لمدة 15 دقيقة، بعدها أجريت تخافيف عشارية حتى التخفيف 10^{-4}. وتم الكشف عن الفطريات في كل تخفيف بطريقة النشر على الأطباق، وذلك بنشر0.1 مل من كل تخفيف على سطح PDA بمكررين. وطريقة المزج وذلك بمزج 1 مل من كل تخفيف مع وسط PDA وبمكررين. قدر عدد الفطريات بحساب عدد المستعمرات الكلية لكل واحد غرام جاف من العينة، ثم أجريت عملية الزرع المتكرر على الأطباق لتنقية العزلات النامية (Freire وآخرون، 2000).

4- تشخيص الفطريات المعزولة:

4-1- تحديد الأجناس:

تم التعرف على الأجناس الفطرية المعزولة بالاعتماد على مفاتيح التشخيص لكل من Pitt و Hocking (1985)، و Botton وآخرون (1990)، و Champion (1997)، و ذلك بواسطة تحديد الصفات التالية:

- معدل النمو: نمو سريع أو بطيء أو معتدل.
- لون المستعمرات وتوزع اللون .
- لون خلفية المستعمرة.
- تغير لون وسط الزرع نتيجة النمو أو الإفرازات.

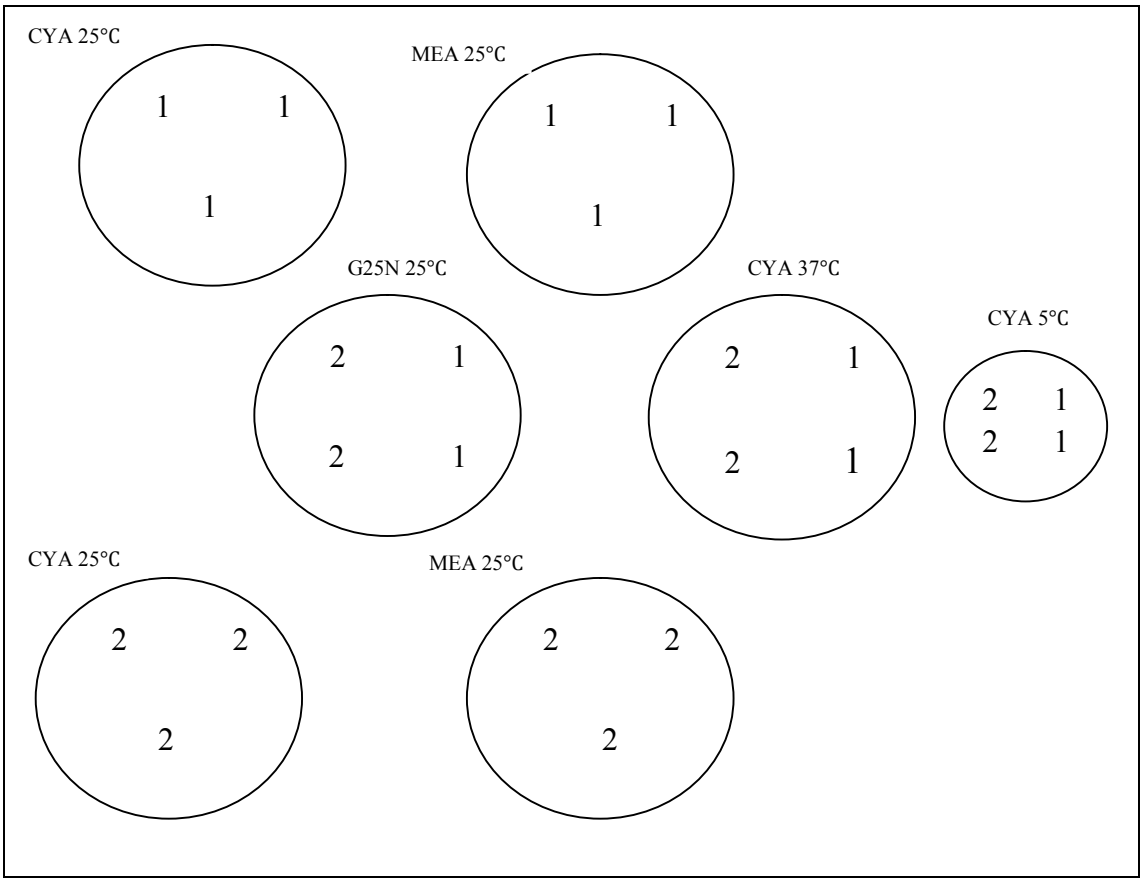
- بنية سطح المستعمرة : مسطحة، مرتفعة ، قطنية حبيبية أو ملساء.
- الرائحة إن وجدت.
- وجود قطرات مائية (Exsuda).
- خصائص الهيفات: اللون، مقسمة أو غير مقسمة.

4-2- تحديد الأنواع:

يتم تحديد الأنواع بالاعتماد على طريقة Pitt و Hocking (1985)، و ذلك باستعمال الأوساط الخاصة بالتشخيص وهي: CYA، MEA، G25N. والتي تعتمد بالدرجة الأولى على تركيب الوسط، والعلاقة بين النشاط المائي ودرجة الحرارة التي تحفظ فيها الأطباق المزروعة وهي: 5°م و 25°م و 37°م (شكل 2). تمت معاينة المستعمرات النامية بعد 7 أيام من الحضن و ذلك بمراعاة الصفات التالية:

- قطر المستعمرة.
- الصفات الماكروسكوبية.
- الصفات الميكروسكوبية.

المستعمرات الصغيرة التي نمت في درجة الحرارة 5°م تلاحظ مباشرة في الطبق باستعمال المكبرة، أما المستعمرات النامية عند درجة 37°م فتفحص بالعين المجردة فقط من حيث اللون وشكل المستعمرة، لأن صفات الأبواغ لا يعتمد عليها في التصنيف عند هذه الدرجة (Pitt و Hocking، 1985).



شكل 2: تشخيص الفطريات حسب طريقة Pitt و Hocking (1985).

1- الفطر الأول. 2- الفطر الثاني.

3-4- تشخيص أنواع *Fusarium*:

بغرض تشخيص أنواع *Fusarium* تم تنميته على وسط PDA ، وذلك لما يعطيه من تنوع كبير في شكل و لون المستعمرة عند زراعته على هذا الوسط. يتميز جنس *Fusarium* بإنتاجه لأبواغ كبيرة شعاعية وهلالية الشكل مقسمة تسمى (Macroconidia)، و أبواغ صغيرة (Microconidia)، و الأبواغ الكلاميدية (Chlamydoconidia) المميزة لبعض الأنواع. ولتشخيص أنواع هذا الجنس لا بد من الأخذ بعين الاعتبار المعايير التالية:

- حجم وشكل Macroconidia.
- وجود أو غياب Microconidia.
- هيئة الحامل الكونيدي الذي تتوضع عليه Microconidia.
- الطريقة التي من خلالها يتم إنتاج Microconidia.
- وجود أو غياب الأبواغ الكلاميدية.
- لون وشكل المستعمرة على وسط PDA.

5- الاختبار البيولوجي لعزلات فطر *F. moniliforme* :

يرمي هذا الاختبار إلى الكشف الأولي عن قدرة عزلات فطر *F. moniliforme* على تثبيط نمو بكتيريا *Escherichia coli* و *Bacillus subtilus* على وسط PDA. حيث زرعت عزلات الفطر على وسط PDA، وحضنت في 25° م لمدة سبع أيام. أما البكتيريا فتم تنميتها في مرق مغذي، و ذلك بحضنها في درجة 37°م لمدة 18 ساعة. بعدها نشر0.1 مل من المعلق البكتيري على وسط PDA. تؤخذ 3 أقراص

من حواف مستعمرة كل عزلة فطرية ذات 7 أيام و توضع بثلاث نقاط متباعدة عن بعضها البعض. تحضن الأطباق لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37°م ، بعد انتهاء فترة الحضن يتم قياس قطر هالة التثبيط: يعتبر التثبيط ضعيفا إذا كان محصورا بين 8 و14 ملم، ومتوسطا إذا كان محصورا بين 14 و 20 ملم، و عاليا إذا كان أكبر من 20 ملم (Mazza، 1983).

6- الدراسة الفسيولوجية لفطر *F. moniliforme* :

في جميع الحالات التالية يتم زرع قرص بقطر 7 ملم مأخوذ من حواف مستعمرة الفطر *F. moniliforme* النامية على وسط PDA في درجة حرارة 25°م لمدة 7 أيام.

6-1- تأثير درجة الحرارة على النمو:

بغرض دراسة تأثير درجة الحرارة على نمو الفطر، تم زرع الفطر على وسط PDA، حضنت الأطباق في درجات حرارة مختلفة 5°، 10°، 15°، 20°، 25°، 30°، 35°، 40°م لمدة 7 أيام وبثلاث مكررات (Kausar وآخرون، 2009).

6-2- تأثير وسط الزرع على النمو:

تم زرع الفطر في أوساط زرع مختلفة، و ذلك بوضع قرص في مركز أطباق تحتوي على الأوساط التالية بثلاث مكررات: PDA، و MEA، و YESA، Saboraud، و Czapek. تحضن الأطباق في درجة حرارة 25°م لمدة أسبوع، بعدها يتم قياس قطر المستعمرة في كل طبق (Farooq وآخرون، 2005).

6-3- تأثير درجة الأس الهيدروجيني على النمو:

لدراسة تأثير درجة الأس الهيدروجيني، تم تحضير حوجلات محتوية على 100مل من الوسط Potato dextrose broth (PDB) بقيم مختلفة من pH: 4، 5، 6، 7، 8، 9، وبعد التعقيم تم إضافة قرص من الفطر لكل حوجلة و بثلاث مكررات. تحضن الحوجلات في درجة حرارة 25°م لمدة أسبوع، بعدها يرشح الوسط عبر ورق الترشيح (Watman N°1). يجفف المسليوم في الفرن لمدة 12 ساعة في درجة حرارة 90°م، ثم يقاس الوزن الجاف للمسليوم (Farooq وآخرون، 2005).

6-4- تأثير الرطوبة النسبية على النمو (RH%):

لدراسة تأثير الرطوبة النسبية على نمو الفطر، ثم تحضير محاليل ذات تراكيز مختلفة من NaCl في الماء المقطر المعقم، وضعت داخل مجففات معقمة (Dessicator) وتركت لمدة 48 ساعة في درجة حرارة 25°م لتتشبع، و ذلك قصد الحصول على درجات مختلفة من الرطوبة النسبية حسب الجدول التالي:

%RH عند 25°م	80	85	90	95
NaCl غ/100مل من الماء المقطر المعقم	32	24	16	8

زرع الفطر في مركز أطباق تحتوي على وسط PDA. ثم وضعت الأطباق مفتوحة داخل المجففات المعقمة و بثلاث مكررات لكل درجة رطوبة. أغلقت المجففات بإحكام بوضع طبقة من الفازلين على الحواف وحضنت في درجة 25°م لمدة 7 أيام. تم قياس أقطار المستعمرات النامية للفطر على محورين متعامدين (Guiraud، 1998).

6-5- تأثير مصدر الكربون:

لدراسة تأثير مصدر الكربون على نمو فطر *F. moniliforme* تم إضافة مصادر مختلفة من الكربون إلى الوسط الأساسي (base medium). تم استعمال أربع مصادر كربون مختلفة، سكر أحادي (غلوكوز)، سكر ثنائي (سكروز)، متعدد السكريات (النشاء و السليلوز)، وحمض عضوي (حمض الستريك)، وذلك بإضافتها كلا على حدى إلى الوسط الأدنى بتركيز 1%. وضع قرص في وسط كل طبق بتري و بثلاث مكررات. تحضن الأطباق لمدة أسبوع في درجة حرارة 25°م، ثم تقاس أقطار المستعمرات (Attrassi وآخرون، 2007).

6-6- تأثير مصدر الآزوت على النمو:

تم إضافة مصادر مختلفة من اللآزوت إلى الوسط الأدنى بتركيز 1.7غ/ل كلا على حدى . مصادر الآزوت المضافة هي حمض أميني (غليسين) و بروتين (ببتون)، و KNO_3، و NH_4Cl، تم زرع الفطر في مركز الأوساط ذات مصادر الآزوت المختلفة. حضنت الأطباق لمدة 7 أيام في 25°م بثلاث مكررات، بعدها يتم قياس قطر المستعمرة في كل طبق (Attrassi وآخرون، 2007).

7- المستقلبات الثانوية لفطر *F. moniliforme* :

7-1- إنتاج السموم الفطرية:

استعملت في إنتاج السموم عزلة واحدة من عزلات *F. moniliforme*، وهي التي أعطت أكبر قطر للتشبيط. حيث تمت زراعتها على وسط PDB، وذلك بتلقيح ثلاث حوجلات سعة كل منها 250 مل والمحتوية على 50 مل من الوسط بقرص قطره 7 ملم، مأخوذ من حواف مستعمرة الفطر المنماة على وسط PDA في درجة حرارة 25°م لمدة أسبوع. حضنت الحوجلات في الظلام في درجة حرارة 25°م لمدة 20 يوم (Amadi وآخرون، 2009).

7-2- الاستخلاص:

بعد انتهاء فترة الحضن يرشح الوسط عبر ورق Watman N°1، ويضاف للرشاحة الموجودة في حوجلة سعتها 250 مل ما يعادل حجمها (50 مل) من الكلوروفورم. يرج الخليط جيدا لمدة 10 دقائق في خلاط آلي، ثم يفرغ في حوجلة ترسيب ويترك حتى تفصل المرحلتين. يسترجع المذيب في حوجلة جديدة، في حين يخضع الجزء المائي للاستخلاص مرة ثانية بنفس الطريقة. تضاف مرحلة المذيب المتحصل عليها لاحقا إلى الحوجلة السابقة (المذيب العضوي)، ويمرر المستخلص عبر ورق الترشيح (Watman N°1) المحتوي على كبريتات الصوديوم اللامائية (Na_2SO_4 anhydryde) لإزالة الماء المتبقي. يركز المستخلص بعد ذلك بواسطة جهاز التكثيف الدوراني Rotavapor (Buchii 419) في درجة حرارة 40°م. بعدها يعاد إذابته في1 مل من الكلورفورم، و يوضع في أنبوب زجاجي محكم الإغلاق، حيث يحفظ في الثلاجة إلى غاية الاستعمال (Kollu و وآخرون، 2009).

7-3- الفصل بواسطة كروماتواغرافيا الطبقة الرقيقة:

تعتبر هذه التقنية شائعة الاستعمال في الفصل و الكشف عن السموم الفطرية. حيث تعتمد على توزيع المادة بين درجة ادمصاصها على المرحلة الثابتة (سليس) و ذوبانها في المرحلة المتحركة (المذيب). ويقاس هذا التوزع بحساب معامل الانسياب (Rapport frontal)، والذي يكون خاصا بكل مركب.

استخدمت ألواح هلام السلكا الجاهزة (Sil. gel on PET foils. without fluorex ind) لفصل محتويات المستخلص. حيث يتم تنشيط الألواح في درجة حرارة 110°م لمدة 30 دقيقة، ثم يوضع حجم 10 µl من المستخلص على خط الانطلاق الوهمي للألواح الذي يبعد عن القاعدة بـ 15 ملم، بالإضافة إلى 5 µl من السم القياسي T_2-toxin، وقبل هذا تم تحضير الحوض وذلك بسكب محلول الهجرة لمدة ساعتين ليتشبع بالمحلول. أجريت الهجرة على مسافة 15سم في أنظمة مختلفة من المذيبات العضوية التالية:

- Formic acid : Ethyl acetate : Toluene (1 :4 :5)

- H_2O : Acetic acid : Ethyl acetate (1 :3 :6)

بعد وصول الطور المتحرك إلى مسافة الهجرة، تخرج الصفيحة وتترك لتجف في الهواء وتتم مشاهدتها في الضوء المرئي و في الأشعة فوق البنفسجية (UV) بطول موجة 254 و 365 نانومتر، و باستعمال الكاشف p-anisaldehyde (0.5% في Acetic acid :Sulfuric acid : Methanol. 90: 5: 5)، و حمض الكبريت 20%. كما يتم حساب معامل الانسياب لكل البقع الملاحظة.

8- المكافحة البيولوجية:

8-1- المكافحة البيولوجية باستعمال فطر *T. harzianum*:

بهدف إظهار طرق تأثير فطر *T. harzianum* على نمو فطر *F. moniliforme* تم إجراء مايلي: الزرع الثنائي، الزرع على الشريحة، تأثير المواد الطيارة، و تأثير المواد غير الطيارة.

8-1-1- الزرع الثنائي:

تم اختبار قدرة تثبيط فطر *T. harzianum* لفطر *F. moniliforme* حسب طريقة Siameto وآخرون (2010). حيث أخذ قرص بقطر 5 ملم من حافة مستعمرة *T. harzianum* النامية لمدة 7 أيام، ووضع على بعد 1سم من حافة طبق بتري المحتوي على وسط PDA، وعن بعد 5 سم من فطر *T. harzianum* وضع قرص 5 ملم لفطر *F. moniliforme* المأخوذ من حواف مستعمرة نامية لمدة 7 أيام، وفي الطبق الشاهد تم استبدال قرص *T.*

harzianum بقرص PDA معقم. حضنت الأطباق لمدة سبع أيام في درجة حرارة 25°م بثلاث مرات، بعدها يتم قياس نسبة التثبيط حسب العلاقة التالية:

$$\mathbf{L = [(C - T) / C] \times 100}$$

L: نسبة التثبيط.

C: قطر مستعمرة الفطر *F. moniliforme* في الطبق الشاهد.

T: قطر مستعمرة الفطر *F. moniliforme* في الطبق الشاهد في وجود *T. harzianum*.

8-1-2- الزرع على الشريحة:

تم وضع شريحة زجاجية معقمة في طبق بتري، ثم نشرت عليها كمية قليلة من وسط PDA، بحيث تشكل طبقة رقيقة، وعلى حافتي هذه الشريحة تم وضع قرصين بقطر 7 ملم أحدهما لفطر *F. moniliforme* والآخر لـ *T. harzianum*. تمت إضافة قطرات من الماء المقطر المعقم إلى الطبق لتجنب جفاف الوسط، وحضن الطبق في درجة حرارة 25°م لمدة 3 - 5 أيام. وعند انتهاء فترة الحضن تلاحظ منطقة الالتقاء بالمجهر الضوئي (Siameto وآخرون، 2010).

8-1-3- تأثير المواد الأيضية الطيارة المفرزة من طرف فطر *T. harzianum* :

اختبر تأثير المواد الطيارة المفرزة من طرف *T. harzianum*، بزرع قرص بقطر 7 ملم لفطر *T. harzianum* في مركز طبق بتري يحتوي على وسط PDA. ويتم استبدال غطاء هذا الطبق بقاعدة طبق بتري آخر ملقح في المركز بقرص قطره 7 ملم لفطر *F. moniliforme*، و يثبتان جيدا باستعمال prafilm. يلقح طبق بتري آخر بقرص قطره 7 ملم لفطر *F. moniliforme* كشاهد. تجرى التجربة بثلاث مكررات، مع حضن الأطباق في درجة حرارة

25°م لمدة 7 أيام. بعدها يقاس النمو الشعاعي لـ *F. moniliforme* وتقدر نسبة التثبيط كما تم ذكره سابقا (Anees وآخرون، 2010).

8-1-4- تأثير المواد غير الطيارة لفطر *T. harzianum*:

زرع قرص بقطر 7 ملم لفطر *T. harzianum* في 100 ملم من وسط PDB، وحضن في درجة حرارة 20°م لمدة 10 أيام. بعد انتهاء فترة الحضن يرشح المسليوم، ثم تعرض الرشاحة لعملية الطرد المركزي 1000 rpm لمدة 15 دقيقة، ثم تمرر عبر ورق ترشيح بقطر 0,45 µm ثم 0,2 µm بغرض تعقيمها. بعدها يضاف 2 مل من الرشاحة إلى 25 ملل من وسط PDA (45 - 50°م) ويحرك جيدا. وبعد تصلب الوسط يلقح في المركز بقرص 5 ملم لفطر *F. moniliforme* ، أما الطبق الشاهد فيكون بدون إضافة الرشاحة. تجرى التجربة بثلاث مكررات، مع حضن الأطباق في درجة حرارة 25°م لمدة 7 أيام. بعدها يقاس النمو الشعاعي للفطر *F. moniliforme* وتقدر نسبة التثبيط كما تم ذكره سابقا (Siameto وآخرون، 2010).

8-1-5- إنتاج وفصل المستقلبات الثانوية لفطر *T. harzianum*:

نمي الفطر على الوسط PDB و ذلك بأخذ قرص بقرص 7 ملم من حواف مستعمرة فطر *T. harzianum* النامية على وسط PDA لمدة سبع أيام و إضافته إلى حوجلة بحجم 250 ملل تحتوي على 50 ملل من الوسط. تحضن في درجة حرارة 25°م لمدة 12 يوم بثلاث مكررات. بعد انتهاء فترة الحضن يرشح الوسط باستعمال ورق الترشيح (Watman N°1)، وتمت عملية الاستخلاص بإضافة 50 ملل من Ethyl acetate ورجه جيدا. بعد

نهاية الفصل يمرر المذيب عبر ورق ترشيح يحتوي على كبريتات الصوديوم اللامائية لنزع الرطوبة .ثم بخر باستعمال جهاز التكثيف الدوراني Rotavapor (Buchii 419) في درجة حرارة 40°م و يعاد إذابة الجزء الباقي في 1 مل من Ethyl acetate (El-hasan وآخرون، 2009).

بغرض فصل محتويات المستخلص، استخدمت ألواح هلام سلكا الجاهزة للاستعمال (Sil. gel on PET foils. without fluorex ind ، حيث يتم تنشيط الألواح في درجة حرارة 110°م لمدة 30 دقيقة، ثم يوضع حجم 15 µl من المستخلص على خط الانطلاق الوهمي للألواح الذي يبعد عن القاعدة بـ 1.5 سم، وتجرى الهجرة على مسافة 15 سم من خط الانطلاق الوهمي على نظام الهجرة:

- toluene :ethyl acetate :formic acid (5: 4: 1)

بعد وصول الطور المتحرك إلى مسافة الهجرة، تخرج الصفيحة وتترك لتجف في الهواء وتتم مشاهدتها في الضوء المرئي و في الأشعة فوق البنفسجية (UV) بطولي موجة 254 و 365 نانومتر.

8-2- المكافحة البيولوجية باستعمال خميرة *Debaryomyces hansenii*:

8-2-1- تنشيط الخميرة لنمو الفطر:

يتم تنشيط الخميرة بزرعها في وسط YPD لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 28°م، بعد ذلك تستعمل في مكافحة الفطر *F. moniliforme* بطريقتين مختلفتين هم:

أ- تنشيط الفطر وفق طريقة Elwakil وآخرون (2009):

زرعت الخميرة على شكل خط مستقيم في منتصف طبق بتري يحتوي على وسط PDA، ثم يحضن في درجة حرارة 25°م لمدة يومين. بعدها يؤخذ قرص بقطر 7 ملم من حواف مستعمرة *F. moniliforme* ويوضع عن بعد 30 ملم من خط الخميرة (شكل 3). في الطبق الشاهد يتم بزرع الفطر دون الخميرة وبثلاث مكررات. تحضن الأطباق لمدة 7 أيام في درجة حرارة 25°م. ويتم قياس نسبة التثبيط حسب العلاقة التالية:

$$L = [(C - T) / C] \times 100$$

L: نسبة التثبيط.

C: نصف قطر مستعمرة الفطر *F. moniliforme* في الطبق الشاهد.

T: المسافة من مركز مستعمرة الفطر إلى الحافة المجاورة لخط الخميرة.

ب- تثبيط الفطر وفق طريقة Raspor وآخرون (2010):

على وسط NDYA تم زرع الخميرة على شكل خط مستقيم يبعد عن طرف طبق على بتري بـ 20 ملم، وعن بعد 32 ملم من هذا الخط يوضع قرص للفطر (7 ملم) مأخوذ من حواف مستعمرة نامية على وسط PDA لمدة 7 أيام. تحضن الأطباق لمدة 7 أيام في 25°م بثلاث مكررات (شكل4). و يتم قياس نسبة التثبيط حسب العلاقة التالية:

نسبة التثبيط = المسافة 1 / (المسافة 1 + المسافة 2) × 100

8-3- تأثير المواد الطيارة المفرزة من طرف *D. hansenii* :

تم اختبار تأثير المواد الطيارة حسب طريقة weiwei وآخرون (2008) مع إجراء بعض التعديلات. حيث نميت الخميرة على وسط YPD لمدة 24 ساعة في 28°م. بعدها أجريت عملية الطرد المركزي (6000 rpm) لمدة

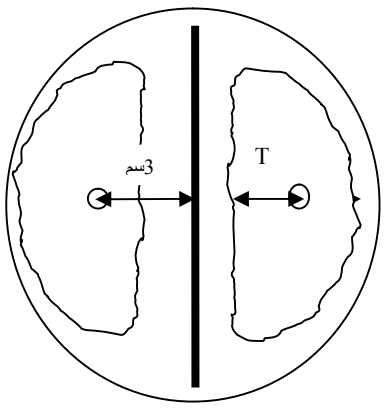
10 دقائق، وتم غسلها مرتين بالماء المقطر المعقم، ثم أجريت سلسلة من التخافيف العشارية إلى غاية التخفيف 10^{-4}، ويتم تقدير عدد الخلايا بنشر 0.1 مل من كل تخفيف على وسط PDA (Hernández-Montiel وآخرون، 2010). لقح وسط PDA بقرص قطره 5 ملم مأخوذ من حواف مستعمرة الفطر، أما الخميرة فنشرت على سطح وسط PDA (10^4 خلية/مل)، ثم استبدل غطاء هذا الأخير بقاعدة الطبق الملقح بالفطر ويغلق جيدا بـ Parafilm. يكون الطبق الشاهد بدون الخميرة. تحضن الأطباق في درجة حرارة 25°م لمدة 7 أيام مع إجراء ثلاث مكررات. وتقاس نسبة التثبيط حسب العلاقة التالية:

$$\mathbf{L = [(C - T) / C] \times 100}$$

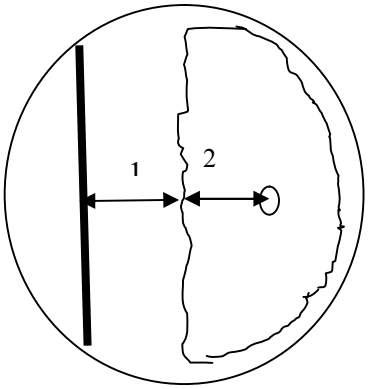
L: نسبة التثبيط.

C: قطر مستعمرة الفطر *F. moniliforme* في الطبق الشاهد.

T: قطر مستعمرة الفطر في وجود الخميرة.



شكل 3: تثبيط الفطر وفق طريقة Elwakil وآخرون (2009)



شكل4 : تثبيط الفطر وفق طريقة Raspor وآخرون (2010).

8-2-4- مكافحة الفطر في المخازن المصغرة (*mini silo*):

بغرض إظهار مدى تأثير الخمائر على نمو الفطريات في أماكن تخزين الحبوب، تم تحضير معلق بوغي لكل من الخميرة والفطر، والمتمثلة في حقن الذرة بكل من الفطر المراد مكافحته والخميرة معا. قبل ذلك تم تحضير معلق بوغي لكل منهما، حيث نمي الفطر على وسط PDA في درجة حرارة 25°م لمدة 10 أيام، ثم يضاف له 10 مل من الماء المقطر المعقم. يكشط السطح بلطف و يرشح عبر شاش معقم، و بعد ذلك تجرى التخافيف العشارية

حتى 10^{-4}. ويتم تقدير عدد الأبواغ و الخلايا بنشر 0.1 مل من كل تخفيف على وسط PDA (Li وآخرون، 2010). أما الخميرة فيحضر المعلق البوغي كما ذكر سابقا.

تم جلب ذرة غير معقمة ذات رطوبة نسبية 7%، يضاف لها الماء إلى غاية الحصول على 25% رطوبة، بعدها تحفظ لمدة 48 ساعة في درجة حرارة 2°م بغرض توازن المحتوى المائي. توزع الذرة في أنابيب اختبار (القطر 1.5 ملم والطول 15سم). يتم حقن الذرة بالفطر *F. moniliforme* (10^{3} CFU / غ) والخميرة *D. hansenii* (10^{5} CFU / غ) في آن واحد. حيث يضاف كل منهما على شكل قطرات، وتحرك الأنابيب جيدا بغرض التوزيع الجيد للأبواغ. تغلق الأنابيب بسدادة مطاطية ملائمة لفوهة الأنابيب وتمرر خلالها إبرة لتسريب الهواء (شكل5).

تحضن أنابيب الاختبار (المخازن المصغرة) لمدة 14 يوما في درجة حرارة 25°م (الدرجة المثلى لنمو الفطر *F. moniliforme*). يحفظ الأنبوب المحقون بالفطر فقط كشاهد. تجرى التجربة بثلاث مكررات.

بعد انتهاء فترة الحضن يتم تقدير عدد الخلايا وذلك بمجانسة الحبوب. يؤخذ 1غ منها ويضاف إلى 9 مل من الماء المقطر المعقم، ثم تجرى سلسلة من التخافيف إلى غاية التخفيف 10^{-4}، بعدها يتم نشر 0.1 مل من كل تخفيف على وسط PDA (Druvfors وآخرون، 2005؛ Mokiou و Magan، 2008).

يعبر عن درجة تثبيط الخميرة للفطر، بعدد الوحدات المكونة للمستعمرة للفطر في الغرام الواحد بعد نهاية فترة الحضن في وجود الخميرة، وتقسم درجة التثبيط إلى أربع رتب:

- **(-)** $< 10^{5}$ لا يوجد تثبيط.
- **(+)** $10^{4} - 10^{5}$ تثبيط ضعيف.
- **(++)** $10^{3} - 10^{4}$ تثبيط.

- **(+++)** $> 10^3$ تثبيط جيد .

❖ تم إجراء الدراسة الإحصائية باستعمال برنامج SAS بإجراء اختبار one-way- ANOVA ، المتبوع باختبارStudent-Newman-Keuls multiple-range test.

شكل5: المخازن المصغرة.

تشكرات

إن الشكر لله وحده، أحمده سبحانه وتعالى على أن وفقني لإتمام هذا البحث.

أتقدم بجزيل الشكر والاحترام الفائق للأستاذ المشرف **لعروس العربي**

على متابعته لهذا العمل و توجيهاته ونصائحه النيرة.

كما أتقدم بالشكر الجزيل لأعضاء لجنة المناقشة:

الأستاذ **غول مصطفى**، الدكتور **زروق محمد ميهوب**، الدكتور **بلحطاب رشيد**

على قبولهم مناقشة وإثراء هذا البحث.

كما أشكر كل من ساعدني على انجاز هذا البحث.

1 – تلوث البذور بالفطريات:

تعتبر الحبوب مصدرا مهما للغذاء، وتمثل الجزء الأكبر للإنتاج الغذائي. وتتعرض للتلوث بالفطريات، والتي يؤدي تواجدها بالحبوب إلى خسائر اقتصادية كبيرة. فهي تقلل من الإنتاج الكمي والنوعي، حيث تتسبب في مجموعة من الأمراض وهي: عقم و تعفن و صغر حجم البذور، الموت الموضعي للبذور، انخفاض أو عدم القدرة على الإنبات، و تلون البذور ونقص القيمة الغذائية لها.

يتسبب في عقم البذور مجموعة من الفطريات التابعة للفطريات الناقصة، حيث تستهدف الأزهار و البذور الصغيرة، أين تستبدل الأعضاء الزهرية للنبات العائل بالتراكيب الثمرية للفطريات، مثل ما يحدثه فطري *Fusarium moniliforme* و *F. graminearum* في القمح و الذرة والشعير. أما صغر حجم البذور، فيتسبب فيه مجموعة من الفطريات مثل *Alternaria brassicicola*، حيث تحدث نقص شديد في حجم الحبوب عند النجيليات، والفطر *Ascochyta rabiei* في الحمص. قد تحدث الفطريات تعفن البذور خلال الإنبات أو عند النضج، مثل ما يحدثه *F. moniliforme* و *F. culmorum* و *F. graminearum* على الذرة، أو *Derechslera oryzae* على الأرز. تتسبب كثير من الفطريات المسؤولة عن تعفن البذور في موت موضعي سطحي على البذور مثل ما يحدثه فطر *Ascochyta* على الفاصوليا والحمص واللوبيا، حيث تحدث مناطق ميتة في موقع الإصابة. و قد يشير تغير لون البذور إلى وجود فطريات، والتي تتسبب في موت مناطق على البذور وتغير لونها، حيث تصبح بلون بني أو رمادي مثل ما يحدثه *F. moniliforme* و *Phoma* sp على الذرة. كما قد يكون تلون البذور ناتج عن نمو الفطريات، مثل اسوداد الحبوب نتيجة التلوث الكبير بالفطر وتغليف الأبواغ لسطح الحبوب. ويكون فقدان القدرة على الإنبات ناتج عن الموت الموضعي أو التعفن الممتد عميقا في البذور وحتى الإصابات التي لا تسبب تعفنا. حيث تقلل هذه الأمراض من حيوية البذور وقدرتها على الإنبات، إذ تظهر

حبوب القمح والشعير التي تحتوي على الفطريات *Ustilago nuda* و *U. tritici* مقاومة أقل للظروف الحقلية غير المناسبة (Neergard، 1977). تصيب الحبوب العديد من الفطريات والتي تنقسم إلى مجموعتين: فطريات الحقل وفطريات التخزين.

1-1- فطريات الحقل:

تصيب هذه الفطريات المحاصيل أو الحبوب قبل الحصاد، أي عندما تكون النباتات في الحقل، حيث تختلف فطريات الحقل حسب المحصول الزراعي، والموقع الجغرافي والطقس. ومن أهمها جنس *Alternaria* و *Helminthosporium* و *Cladosporium* و *Fusarium* . فجنس *Alternaria* على سبيل المثال لا يصيب النجيليات فقط بل حتى الفول السوداني، وقد تعطي نسبة ظهور هذا الجنس في الحبوب فكرة عن عمر المحصول و عن ظروف تخزينه. فقد يعزى وجود هذا الفطر بنسبة 90 % فما فوق إلى أن هذا المحصول حصد مؤخرا، أو أنه خزن في ظروف جيدة لم تسمح لفطريات التخزين بالظهور والنمو عليه. أما بخصوص جنس *Helminthosporium* فإنه يعتبر ملوثا كبيرا للنجيليات ويزداد ظهوره وانتشاره عندما تكون الفترة ما قبل الحصاد رطبة، حيث يتسبب في زوال لون الحبوب، وموت النباتات الصغيرة، وتعفن الجذور وكذلك تلف النبات الناضجة، لكنه لا يسبب أي ضرر في التخزين. جنس *Cladosporium* هو الأخر واسع الانتشار في النجيليات التي تتعرض للرطوبة أثناء الحصاد و لا يعرف له أي تأثير على الحبوب أثناء التخزين (Christensen و Kaufmann، 1969). أما بخصوص *Fusarium* فيعتبر ملوثا كبيرا للقمح والشعير وخصوصا الذرة (Logrieco وآخرون، 2003). وعلى العموم فإن فطريات الحقل تسبب أضرارا للمحاصيل الزراعية في الحقل وأثناء الحصاد، وذلك لأنها تتطلب الرطوبة العالية للنمو، وفي العادة يتوقف نشاط هذه الفطريات خلال التخزين، و يخضع ذلك لعمر المحصول والمحتوى المائي للحبوب ولدرجة حرارة التخزين (Christensen و Kaufmann، 1969).

1-2- فطريات التخزين:

هي الفطريات التي تصيب الحبوب أثناء التخزين. وهي لا تصيب المحاصيل الزراعية في الحقل، بل بعد الحصاد وأثناء التخزين، وتشمل مجموعة من الفطريات التي تنتمي إلى جنس *Aspergillus* و *Penicillium* و *Sporendonema*. هذه الفطريات لها القدرة على النمو في غياب الماء الحر، وبعضها لا تتحمل ذلك فحسب، بل تتطلب الضغط الأسموزي المرتفع لكي تنمو (Christensen، 1975). عند تخزين الحبوب في ظروف سيئة فإن بعض فطريات الحقل قد تظهر مثل فطر *Fusarium* الذي يظهر على الذرة المخزنة (Champion، 1997). وتظهر هذه الفطريات أثناء تخزين الحبوب، ومصدرها هو الأبواغ المتواجدة على سطح الحبوب أو أجزاء المسليوم داخل غطاء الحبوب. وتكون بتراكيز منخفضة، في الغالب أقل من 1% ومع ذلك تكون كافية لإحداث الإصابة عند توفر الظروف المناسبة لنموها. ففي المرحلة الأولى تكون فطريات الحقل هي السائدة ثم تقل تدريجيا، بعدها تظهر فطريات التخزين النموذجية. ومن أهم العوامل المؤثرة على ظهورها على الحبوب المخزنة، المحتوى المائي للحبوب، درجة الحرارة ومدة التخزين، فترة إصابتها بفطريات التخزين، وجود ونشاطية الحشرات والقوارض (Christensen و Kaufmann، 1969).

1-3- تأثير الفطريات على الحبوب المخزنة:

تعتبر كل من القوارض والحشرات والفطريات المتسبب الرئيسي في تلف البذور المخزنة. وتصيب الفطريات

الحبوب في الحقل، كما يمكنها النمو بعد الحصاد وأثناء النقل والتخزين. وفي هذه المرحلة فإن الفطريات تتسبب في خفض الإنبات، تلون البذور أو الحبوب جزئيا، ارتفاع الحرارة والتعفن، تغيرات بيوكيميائية مختلفة، إنتاج السموم الفطرية، ونقص في الوزن (Christensen و Kaufmann، 1969).

تعد إصابة الأجنة بفطريات التخزين إحدى الأسباب التي تؤدي إلى انخفاض النسبة المئوية لإنبات البذور. حيث تمت المقارنة بين بذور خالية تماما من فطريات التخزين وبذور أخرى مصابة بها، فوجد أن بذور البازلاء قد فقدت قدرتها على الإنبات خلال ستة أشهر، نتيجة لإصابتها بأنواع فطر *Aspergillus* (*A. flavus* و *candidus* .*A*و *A. ruber*)، بينما احتفظت البذور غير المصابة بنسبة إنبات تصل إلى 95 %. كما تتسبب فطريات التخزين في تلون البذور (الجنين)، فحبوب القمح ذات الأجنة الداكنة تعتبر حبوبا ميتة، وذات قيمة غذائية منخفضة ولا تنبت عند زراعتها، ويكون ذلك بسبب فطريات التخزين (Neergard، 1977). قد يصاحب نمو الفطريات على الحبوب المخزنة التي تحتوي على دهون أو زيوت زيادة في الأحماض الدهنية، والتي تتسبب في تغير طعم الحبوب ونكهتها. ويكون ذلك ناتج عن نمو فطريات التخزين عندما تكون الرطوبة ملائمة لنموها حيث تفرز إنزيم Lipase، ويختلف إنتاج هذا الإنزيم حسب الفطريات والحبوب المخزنة (Christensen وKaufmann، 1969). ترتفع درجة حرارة المواد العضوية الرطبة أثناء التخزين كما هو الحال عند تخزين الحبوب. حيث يعتبر الارتفاع الذاتي لدرجة الحرارة في الحبوب الرطبة المخزنة عملية حيوية، وتعد الميكروبات مسؤولة عن معظم التسخين الذي يحدث (Neergard، 1977).

تنتج العديد من فطريات الحقل والتخزين مجموعة من السموم الفطرية التي تكون سامة للإنسان والحيوان(Kumar وآخرون، 2008). ويعتمد إنتاج هذه السموم على نوع الفطر والظروف البيئية الملائمة لنموه، خاصة المصدر الغذائي، ودرجات الحرارة والرطوبة. ومن أهم الفطريات المنتجة للسموم بعض الأنواع التابعة للأجناس التالية: *Aspergillus*، *Penicillium*، *Fusarium*، *Alternaria*، و *Trichothecium*، إضافة إلى فطريات أخرى (Bennett و Klich، 2003). و يجب الإشارة إلى أن الحبوب قد تكون ملوثة بالسموم دون أن تظهر عليها أي أعراض للتعفن (Neergard، 1977).

1-4- أهمية البذور في نقل الأمراض:

يوجد اختلاف كبير بين أنواع البذور ومعدل نقلها لأي مسبب مرضي، وفي عدد المسببات المرضية التي تنقلها. ويكون انتقال الأمراض بالبذور شائعا في محاصيل الحبوب والبقوليات. ويعتمد انتقالها أساسا على العائل والكائن الممرض، أي قابلية العائل للإصابة ومدى خطورة الكائن الممرض وطبيعة التفاعل بينهما. وقد يكون انتقال الكائنات الممرضة بالبذور سائدا في بعض العائلات النباتية ونادرا في أخرى. مثل فطريات التفحم في النجيليات، وأنواع جنس *Colletotrichum* في البقوليات (Neergard، 1977). كما تعتبر البذور عاملا أساسيا في انتقال الأمراض بين الدول وذلك عن طريق التبادلات التجارية (Champion، 1997).

تتعرض الحبوب (الذرة، الأرز، القمح والشعير) و كذلك الفول السوداني و التوابل (الفلفل الأسود، الزنجبيل) للتلوث بالفطريات، وعند توفر الظروف المناسبة لنموها، فإنها تفرز السموم الفطرية، التي يمكنها أن تنتقل من الحقل مرورا بمرحلة التخزين وحتى أثناء عمليات تحويل الأغذية، أين تتراكم في المنتجات النهائية، حيث يكون لها تأثيرا سلبيا على صحة الإنسان والحيوان (Reboux ، 2006؛ Kumar وآخرون، 2008).

2- الأهمية الاقتصادية للذرة:

تستعمل الذرة في تغذية الإنسان خصوصا في إفريقيا وآسيا وأمريكا اللاتينية. أما في الدول المتقدمة فيوجه أكثر من ثلاث أرباع حبوب الذرة المنتجة إلى تغذية الحيوانات، خصوصا المواشي والخنازير والدواجن. والجزء المتبقي يستعمل في الصناعة الغذائية (النشاء، المواد المحلية). كما تستعمل الذرة في إنتاج المشروبات الغازية و الايثانول، ففي الولايات المتحدة الأمريكية تم استعمال 10 مليون طن من الذرة سنة 1990 في إنتاج الايثانول كمصدر للطاقة (James، 2003). كما تستعمل الذرة في الصناعية الصيدلانية (Nicolie وآخرون، 2009).

3- فطر *Fusarium* :

يعتبر *Fusarium* من أهم الأجناس الفطرية نظرا لتنوعه الكبير وانتشاره الواسع، ولما يسببه من أضرار للنبات والحيوان، و كذلك قدرته على إنتاج السموم الفطرية. و يوجد في التربة و الأجزاء الترابية والهوائية للنباتات و في بقايا النباتات (Avalos و Estrada، 2010). وهو واسع الانتشار في المناطق الاستوائية و المعتدلة و يوجد حتى في المناطق ذات المناخ القاسي (الصحاري والمناطق القطبية). ويعرف بأنه من فطريات التربة نظرا لكثرة تواجده بها و بجذور النباتات، إما متطفلا أو رميا، لكنه ينتشر ليصيب الأجزاء الهوائية للنباتات أين يتسبب في تلف المحاصيل الزراعية (Nelson وآخرون، 1994 ؛ Logrieco وآخرون، 2003).

3-1- الأهمية الاقتصادية:

يعتبر جنس *Fusarium* من أهم الفطريات التي تصيب النباتات والمنتجات الزراعية، كمتطفل على النبات أو رمي على بقايا النباتات العضوية و السليلوزية. العديد من الأنواع التابعة لهذا الجنس تسبب مجموعة من أمراض النباتات مثل الذبول، تلف وتعفن الجذور والسيقان و الشجيرات وسنابل النجيليات، و الحبوب والفواكه. و يعتبر أيضا المسبب الرئيسي لتلف الخضر والفواكه المخزنة، والتي عادة ما تصاب قبل الحصاد. مم يتسبب في نقص الإنتاج بحوالي 10-30% (Logrieco وآخرون، 2002). بعض أنواع *Fusarium* لها القدرة على إنتاج مجموعة من السموم الفطرية والتي يمكنها أن تتراكم في النباتات المصابة قبل الحصاد أو أثناء التخزين، وحتى في سلسلة التحويلات الغذائية، مما يشكل خطرا كبيرا على النبات والحيوان و الإنسان (Logrieco وآخرون، 2003) (جدول 1). إن تلوث الحبوب بالفطريات يؤدي إلى خسائر اقتصادية كبيرة، لأنها تصبح غير قابلة للتسويق من جهة، ومن جهة أخرى فإن تناول الحبوب الملوثة يؤدي إلى ظهور أمراض مختلفة عند الحيوان والإنسان (Felicia، 2007).

4- السموم الفطرية:

السموم الفطرية عبارة عن مستقلبات ثانوية، تفرزها مجموعة من الفطريات تنتمي أساسا إلى الأجناس *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* عند نموها في الظروف الملائمة. و هي تتكون في العديد من المنتجات الزراعية، سواء في الحقل أو أثناء التخزين (Yiannikouris و Jouany، 2002؛ Kumar وآخرون، 2008). تم التعرف على السموم الفطرية بانجلترا سنة 1962، أين أدت الإصابة بسم Aflatoxin المفرز من طرف *A. flavus* إلى وفاة ما يزيد عن 100000 ديك رومي وكذلك الخنازير والعجول. بعدها أصبحت وجهة للاهتمام من طرف العديد من العلماء. حاليا تم التعرف على 300-400 سم فطري، والبعض منها يشكل خطرا كبيرا على صحة الإنسان والحيوان (Bennett و Klich ،2003). تعتبر كل من Aflatoxins و Ochratoxins، و Trichothecenes(Deoxynivalenol، Nivaleno، T-2 toxin) و Zearalenone و Fumonisins، و Patulin أهم السموم الفطرية (Brase وآخرون، 2009). وتتميز بوزنها الجزيئي المنخفض، و باختلاف التركيب الكيميائي لها وبقدرتها على إحداث الأمراض للإنسان والحيوان (Bennett و Klich، 2003). حيث تتسبب في حدوث تشوهات في الجنين عند الدواجن، و نزيف دموي حاد، و نقص القدرة على الإنجاب، و فقدان الشهية عند الحيوانات. كما تتسبب في إحداث سرطان الكبد للإنسان، وضعف الجهاز المناعي الذي يؤدي إلى ظهور أمراض أخرى (Felicia، 2007؛ Bennett و Klich، 2003).

4-1- سم Fumonisin :

اكتشف سم Fumonisin سنة 1988، وهو ينتج من تكثف الحمض الأميني (Alanine). يفرز هذا السم من طرف بعض أنواع جنس *Fusarium*، خصوصا *F. moniliforme* و *F. proliferatum* و *F. nygama*

وكذلك *Alternaria alternata* (Bennett و Klich، 2003). كما وجد أيضا أن *Aspergillus niger* ينتج هذا السم (Mogensen و آخرون، 2009).

يتسبب Fumonisin في حدوث تسمم في الجهاز العصبي للفرس والأرانب، كما يحدث تسممات وسرطانات كبدية للفئران. ويحتمل أنه يسبب سرطان المريء للإنسان، حيث أن وجود هذا السم الفطري في الحبوب مرتبط بازدياد حالات الإصابة بسرطان المريء في جنوب إفريقيا والصين وشمال ايطاليا والولايات المتحدة الأمريكية. كما نتج عن تناول خبز مصنوع من حبوب ملوثة بـ *Fusarium* بالهند في حدوث تسمم غذائي في 27 قرية (آلام في البطن وإسهال) (Bennett و Klich، 2003).

إن طريقة تأثير هذا السم معروفة جزئيا على المستوى الخلوي. حيث أنه يعطل العديد من الوظائف البيولوجية للعديد من البروتينات التي تدخل في البناء الحيوي لـ Sphingolipide، و Ceramide، التي تدخل في العديد من الوظائف الخلوية مثل النمو والتميز الخلوي، وإفراز البروتينات وإنتاج أقسام أخرى من Sphingolipide (Fremy، 2009). ويقسم Fumonisin إلى الأنواع B1، B2، B3، B4، حيث يكمن الاختلاف فيما بينها في الجذرين R2 و R1 المرتبطين في ذرتي الكربون 5 و10 (Fremy، 2009).

4-2- الخصائص الفيزيائية والكيميائية لـ Fumonisin:

Fumonisin عبارة عن ثنائي استر (14، 15) للحمض 1، 2، 3 بروبان ثلاثي الكربوكسيل و 2 أمينو 12، 16 ثنائي المثيل 3، 5، 10، 14، 15 هيدروكسي ايكوزان (شكل 1).

وهو مركب قطبي يذوب في الماء نظرا لاحتوائه على الوظائف الكربوكسيلية، ولا يذوب في المذيبات غير القطبية. ويذوب عند الدرجة 103°م و 105°م (Fremy، 2009).

5- العوامل المؤثرة على النمو وإفراز السموم:

إن نمو الفطريات وإنتاجها للسموم ناتج عن تداخل مجموعة من العوامل مثل درجة الحرارة، والرطوبة النسبية، ودرجة الأس الهيدروجيني والمواد الغذائية، والمحيط الغازي. ولهذا فدراسة كل عامل ضروري لفهم العملية الإجمالية للنمو وإنتاج السموم الفطرية. وبالتالي التوصل إلى طرق الوقاية من انتشار الفطريات والسموم الفطرية (Ramirez وآخرون، 2006).

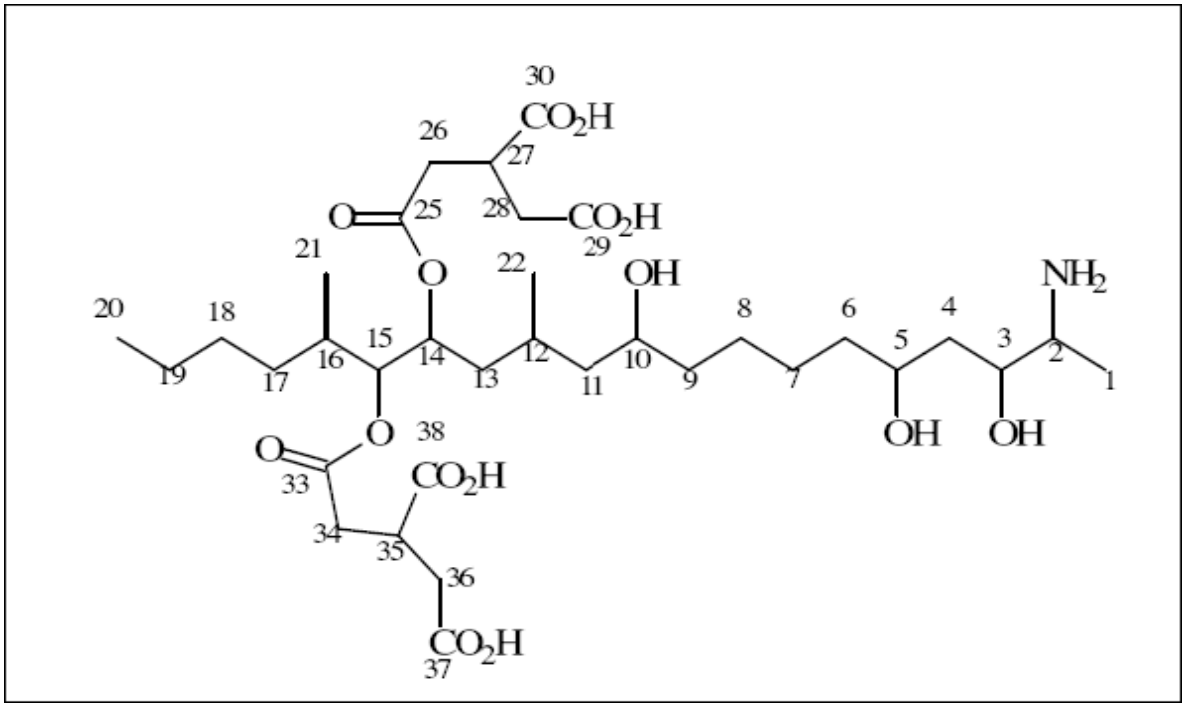
5-1- درجة الحرارة:

تعتبر أغلب الفطريات محبة لدرجات الحرارة المتوسطة 25 و 30°م (*P. expansum* و *A. flavus*)، إلا أنها قد تتكيف وتقاوم التغيرات في درجات الحرارة التي تحدث يوميا أو موسميا. بعضها محبة لدرجات الحرارة المرتفعة حيث تنمو عند 40°م (*Byssochlamys*، *A. fumigatus*)، وأخرى مقاومة لدرجات الحرارة المرتفعة (*A. niger*)، والبعض الآخر محبة لدرجات الحرارة المنخفضة، حيث تنمو جيدا عند الدرجة 10°م (*Cladosporium* و *Alternaria*) (Trigiano وآخرون، 2006 ؛ Brase وآخرون، 2009).

جدول1: أنواع Fumonisin (Fremy، 2009).

Fumonisin	R1	R2	الصيغة الإجمالية	الكتلة المولية
Fumonisin B1	OH	OH	$C_{34}H_{59}NO_{15}$	721,8

705,8	$C_{34}H_{59}NO_{14}$	H	OH	Fumonisin B2
705,8	$C_{34}H_{59}NO_{14}$	OH	H	Fumonisin B3
689,8	$C_{34}H_{59}NO_{13}$	H	H	Fumonisin B4



شكل 1: البنية الكيميائية لـ Fumonisin B1 (Fremy، 2009).

أبواغ الفطريات المحبة للحرارة المتوسطة لا تستطيع الإنبات في درجات حرارية أقل من 5°م، لكنها يمكن أن تقاوم ولمدة طويلة درجات حرارية منخفضة تصل إلى - 20°م. وعلى العموم تكون درجة الحرارة المثلى للنمو قريبة من الدرجة المثلى لإنتاج السموم الفطرية، و في أغلب الحالات تكون هذه الأخيرة أقل مقارنة بدرجة الحرارة المثلى

للنمو(Pfohl-Leszkowicz، 2001). فمثلا تكون درجة الحرارة المثالية لإنتاج سم Aflatoxin من طرف *A. flavus* هي 25°م، في حين يكون النمو مثاليا عند درجة 35°م (Klich، 2007). كما يكون نمو كل من *F. moniliforme* و *F. proliferatum* مثاليا عند الدرجة 25 و30°م و إنتاج $Fumonisin\ B_1$ أعظميا عند درجة الحرارة 20°م (Mogensen وآخرون، 2009).

5-2- الرطوبة:

تعتبر الرطوبة من أهم العوامل المؤثرة على نمو الفطريات، فمعظمها تنمو جيدا في الأماكن الرطبة، حيث تحتاج للرطوبة في نقل الأغذية إلى الهيفا، وحمايتها من الجفاف. كما أن الرطوبة مهمة جدا لإنتاش الأبواغ واختراق النبات العائل وانتشار الفطريات في التربة (Trigiano وآخرون، 2006). يمكن لبعض الفطريات أن تتكيف مع نسب منخفضة من الرطوبة، حيث أنها تمثل مجموعة الكائنات الدقيقة التي تشمل الأجناس الأكثر مقاومة للجفاف. وتعتبر النشاطية المائية 0.65% هي الحد الأدنى للنمو (Botton وآخرون، 1990).

تكون النشاطية المائية المثلى لنمو الفطريات أقل مقارنة بتلك اللازمة لإنتاج السموم الفطرية. فمثلا ينمو فطر *Penicillium verrucosum* عند النشاطية المائية 0.80 فما فوق، في حين لا ينتج هذا الفطر سم OTA إلا إذا كانت الرطوبة النسبية تساوي 0.85 فما فوق (Pfohl- Leszkowicz، 2001؛ Cairns-Fuller وآخرون، 2005). كما ينمو فطر *F. graminearum* في المجال (0.90 - 0.995) من النشاطية المائية لكن إنتاج سم Deoxynivalenol يكون في المجال (0.95 - 0.995) (Ramirez وآخرون، 2006).

5-3- درجة الأس الهيدروجيني (pH):

تنمو الفطريات في مجال واسع من درجة الحموضة (4.5 – 8) مع درجة مثلى بين (5.5 – 7.5). حيث تعدل درجة حموضة الوسط الذي تعيش فيه بالامتصاص الانتقائي للأيونات أو بتبادلها أو عن طريق إنتاج الأحماض العضوية (Botton وآخرون، 1990). بين Keller وآخرون (1997) في دراستهم لتأثير درجة حموضة الوسط على نمو فطر *F. proliferatum* وإنتاجه لسم Fumonisine B1، أنه يوجد تغير في النمو وكمية السم الفطري المنتجة بتغير درجة حموضة الوسط، حيث كان النمو مثاليا عند (pH = 5.6)، في حين كان إنتاج Fumonisine B1 أعظميا عند (pH = 3.7).

5-4- المحيط الغازي:

معظم الفطريات هوائية، حيث تحتاج للأكسجين للنمو. في حين أن البعض الآخر بالإضافة إلى الخمائر لها القدرة على تخمير الكربوهدرات مثل: *Mucor hemialis* و *A. fumigatus* و *F. oxysporum* ، وبعضها لا هوائية (Botton وآخرون، 1990). على سبيل المثال يمكن للفطر *A. flavus* النمو في محيط جوي يحتوي على 61.7% من غاز ثاني أكسيد الكربون (CO_2) و8.7 % من الأكسجين (O_2) و 29.7% من غاز النتروجين (N_2). حيث يتأثر هذا الفطر جدا بتركيز CO_2 مقارنة ب O_2 و N_2، فهو يستطيع النمو في وجود تراكيز عالية من N_2 (99%) أو في تراكيز منخفضة من O_2 (0.5%)، لكن التركيز 80% من CO_2 يثبط نمو الفطر نهائيا (Pfohl-Leszkowicz، 2001). يمكن للفطر *P. verrucosum* النمو في تركيز من CO_2 يصل إلى 25%، وانطلاقا من هذا التركيز يبدأ النمو بالانخفاض بنسبة 40 % إلى 75 % في محيط جوي يحتوي على 50 % من CO_2 (Cairns-Fuller وآخرون 2005).

وعلى العموم فإن عملية إنتاج السموم الفطرية تعتبر أكثر حساسية لتركيب المحيط الجوي مقارنة بالنمو، فالتراكيز الأقل من 1% من O_2 و التراكيز العالية من CO_2 تعيق إنتاج السموم الفطرية (Cairns-Fuller وآخرون،

2005). كما وجد أن كل من *F. moniliforme* و *F. proliferatum* ينموان في غياب CO_2 وفي وجود تراكيز مختلفة منه (10، 20، 30، 40 %). حيث ينخفض النمو كلما ارتفعت نسبته في الوسط، و التركيز 10 % من CO2 يثبط إنتاجFumonisine B1 من طرف *F. moniliforme*، في حين يستطيع فطر *F. proliferatum* النمو وإنتاج Fumonisine B1 في وجود CO_2 بتركيز 40% (Samapundo وآخرون، 2007).

5-5- المواد الغذائية:

يمكن للتركيب الكمي والنوعي للمادة الغذائية (خاصة الكربوهدرات) أن يؤثر على النمو، فهناك العديد من الدراسات التي بينت تغير نمو الفطريات باختلاف أوساط النمو (Farooq وآخرون2005؛ Kausar 2009؛ Lee وMagan، 2010). كذلك يتأثر إنتاج السموم الفطرية بتركيب الوسط، فمثلا وجود حمض الفيتيك (Phytique acid) في الوسط ينقص من إنتاج Aflatoxin من طرف كل من *A. flavus* و *A. parasiticus*، في حين أن وجود البرولين يرفع الإنتاج. كما يرفع حمض الغلوتاميك والبرولين إنتاج Ochratoxin من طرف *A. ochraceus* (Pfohl-Leszkowicz، 2001). إن مصدر الكربوهيدرات له تأثير كبير على إنتاج Aflatoxin من طرف *A. parasiticus*. فوجود كل من الغلوكوز والسكروز في الوسط يزيد من إنتاج هذا السم، في حين أن وجود الفركتوز والرافينوز والمانيتول والغلاكتوز يؤدي إلى انخفاضه (Klich، 2007).

6-5- وجود فطريات أخرى:

بالإضافة إلى العوامل الحيوية (الحرارة و الرطوبة) التي تؤثر على نمو الفطريات، فإن التداخلات الفطرية (Fungal interaction) تؤثر بدورها على نمو الفطريات وإنتاجها للسموم (Velluti و آخرون، 2000). فوجود فطر معين

قد يمنع نمو فطر آخر. فقد بين Torres و آخرون (2003) في دراستهم على انتاش أبواغ كل من *A. ochraceus* و *Alternaria alternata* و *F. verticillioides* على سطح حبوب الذرة عند درجة الحرارة 30° و a_w 0.95 =، أن أبواغ *A. ochraceus* لا يمكنها النمو في وجود *A. alternata* و*F. verticillioides* كلا على حد أو وجودهما معا بعد مرور 60 ساعة من الحضن. في حين أن أبواغ هذا الأخير يمكنها النمو في وجود أو غياب الفطرين الآخرين، وكان معدل نمو *A. alternata* في وجود الفطرين الآخرين أفضل مقارنة بغيابهما. إن إنتاج السموم الفطرية يتأثر بوجود فطريات أخرى، فمثلا وجود *F. graminearum* يثبط انتاج Fumonisin B1 من طرف *F. proliferatum* و يحفز انتاجه من طرف *F. verticillioides* عند 25°م. في حين أن وجود كل من *F. verticillioides* و*F. proliferatum* لا يؤثر على إنتاج Zearalenone من طرف *F. graminearum* (Velluti وآخرون، 2000).

6 – المكافحة البيولوجية:

تتسبب الحشرات والكائنات الحية الدقيقة بالإضافة إلى الأعشاب الضارة والقوارض في خفض الإنتاج الزراعي بما يعادل 45% (vincent و coderre، 1992). في البداية كانت المكافحة البيولوجية تستعمل للسيطرة على الحشرات والأعشاب الضارة، لكنها حاليا أصبحت حلا للعديد من المشاكل الزراعية (Satyanarayana و Kunze، 2009). إن استعمال المبيدات الكيميائية كوسيلة لمكافحة الفطريات أعطى نتائج ايجابية، لكن وبالرغم من هذا، لم تتم السيطرة على الكائنات الممرضة والحد من الخسائر التي تسببها، كما أنها تؤثر سلبيا على المحيط وصحة الإنسان، بالإضافة إلى أن الكائنات الممرضة طورت سبل المقاومة لها. وقد ظهرت المكافحة البيولوجية كوسيلة بديلة للمكافحة الكيميائية، حيث أصبحت وجهة للعديد من الباحثين في هذا المجال. وهي تعني المراقبة والسيطرة على الكائن الممرض بواسطة أحد أو عدة أنواع من الكائنات الحية. والمراقبة في هذه الحالة تعني خفض

تواجد الكائن الممرض إلى غاية التخلص منه (vincent و coderre، 1992؛ Satyanarayana و Kunze، 2009). ويكون ذلك عن طريق التنافس على المكان والغذاء، التطفل، إنتاج المضادات الحيوية، واستحداث المقاومة لدى النبات العائل (Satyanarayana و Kunze، 2009).

6-1- استعمال الفطريات في المكافحة البيولوجية:

إن استعمال الأحياء الدقيقة كعوامل مقاومة هو طريقة جيدة للسيطرة أو الحد من نشاط الكائنات الممرضة للنباتات، وذلك لتنوعها الكبير وكثرة مستقلباتها الثانوية. فقد أثبتت الفطريات نجاعتها في مكافحة العديد من الأحياء الدقيقة الممرضة للنبات (Kaewchai وآخرون، 2009). ومن أهمها فطر *Trichoderma* والذي يمثل 50% من الفطريات المستعملة في المكافحة البيولوجية (Verma وآخرون، 2007). من أهم أنواع هذا الجنس *Trichoderma harzianum*، والذي ثبتت قدرته على تثبيط نمو العديد من الفطريات الممرضة للنبات مثل : *F. moniliforme* (El-Hasan وآخرون، 2009) و *Aspergillus ustus* و *Gibberella zeae* (Kucuk و Kivanc، 2008). و فطر *Rhizoctonia solani* (Montealegre وآخرون، 2010).كما استعمل فطر *Trichoderma viride* في مكافحة كل من *A. niger* و *A. flavus* و *Fusarium* sp (Rajendiran وآخرون، 2010). كما أن فطري *Chaetomium globosum* و *C. cupreum* لهما القدرة على تثبيط نمو كل من *Fusarium* و *Phytophthora* و *Pythium* (Soytong وآخرون، 2001). كذلك فطر *Coniothyrium minitans* له القدرة على التطفل على *Sclerotinia* (Whipps وآخرون، 2008). و من أهم الخصائص الواجب توفرها في العامل المستعمل في المكافحة بيولوجية هي أنه يجب أن يكون: ثابت وراثيا، فعالا عند التراكيز المخفضة، سهولة نموه على الأوساط البسيطة، أن يكون فعالا على أكثر من كائن ممرض، سهولة بقائه لفترة طويلة و سهل التوزيع. كما يجب أن يكون غير ممرض للإنسان ومقاوم للمبيدات، ولا يسبب أمراضا للنبات

العائل. وأن يكون قابلا للنمو في ظروف بيئية مختلفة، متوافقا مع المواد المستعملة الأخرى (Kaewchai وآخرون، 2009؛ Droby وآخرون، 2009).

6-2- آليات المكافحة لدى فطر *T. harzianum* :

يعتبر جنس *Trichoderma* من أهم الفطريات المستعملة في المكافحة البيولوجية، لما له من قدرة على تثبيط الفطريات الممرضة للنبات. وذلك باستخدام آليات مختلفة وهي التنافس على المكان والغذاء، التطفل الفطري، استحداث المقاومة لدى النبات العائل، و إنتاج المواد المضادة للفطريات (Verma وآخرون، 2007؛ Kaewchai وآخرون، 2009).

6-2-1- التنافس على المكان والغذاء:

يحدث التنافس بين الكائنات الحية الدقيقة عندما تتواجد في أماكن ذات غذاء ومساحة محدودين. وقد يكون التنافس على العناصر الغذائية الأساسية والمكان في التربة وعلى جذور النبات العائل (Howell، 2003). و لقد وجد أن التنافس على الغذاء يلعب دورا أكثر أهمية من التنافس على المكان، حيث يتم إقصاء الكائنات ذات التنافس الضعيف من طرف الكائنات ذات التنافس القوي، خاصة عندما يكون مصدر الغذاء محدودا. و عادة ما يحدث على مستوى المنطقة الجذرية الغنية بالمواد العضوية، و يمس خاصة مسببات المرض التي تعيش في التربة مثل أنواع *Fusarium* (Whipps و Lumsden، 1989). وقد لوحظت قدرة فطر *Trichoderma* على التنافس تجريبيا، حيث ينمو بسرعة على أوساط الزرع، مما يعيق نمو الفطر الممرض (El-Hasan وآخرون، 2007).

6-2-2- التطفل الفطري:

يعتبر التطفل الفطري إحدى آليات المكافحة، ويبدأ ذلك بالتعرف على الكائن الممرض، ثم إفراز مجموعة من المواد الطيارة وغير الطيارة بعدها يتم إفراز مجموعة من الإنزيمات المحللة، وأخيرا تحلل الفطر الممرض وموته (Woo وآخرون، 2006؛ Hanson، 2008). وتعتبر الأنزيمات المحللة أقوى وسيلة لمكافحة الفطريات الممرضة، والتي تتمثل في β-1,3-glucanase (Noronha و آخرون، 2000؛ Ramada وآخرون، 2010)، Proteases، Chitinases، Cellulase، Amylase، و Pectinase، Lipase (Whipps، 2001؛ Emma وآخرون، 2008). وهي تعمل على تفكيك الغشاء الخلوي للفطريات الممرضة أثناء عملية التطفل الفطري (Cruz و آخرون، 1992؛ El- Katathy و آخرون، 2001). فإنزيم β-1,3-glucanase له القدرة على تفكيك الغشاء الخلوي وتثبيط نمو وانتاش أبواغ الفطريات الممرضة للنبات (Benitez و آخرون، 2004). كذلك Proteases المفرز من طرف فطر *T. harzianum* يعمل على تفكيك و تحليل الغشاء الخلوي للفطر *Botrytis cinerea* (Elad و Kapat، 1999).

6-2-3- استحداث المقاومة لدى النبات العائل:

عندما تتواجد بعض الأحياء الدقيقة غير الممرضة على النبات فإنها تؤثر عليه ايجابيا، حيث تحفز النمو، كما تساهم في وقايته من الفطريات الأخرى الممرضة. حيث ثبت أن فطر *Trichoderma* يحفز نمو النباتات مثل الطماطم و الخيار والذرة (Lo و Lin، 2002). وذلك عن طريق تحفيز انتاش البذور، وزيادة نمو النبات (الوزن والطول) (Shanmugaiah و آخرون، 2009). كما وجد أن فطر *T. harzianum* يحفز نمو نبات الهيليوم كما يخفض من حدة إصابته بـ فطر *F. oxysporum* (Reid وآخرون، 2002). حيث أنه عند نمو فطر *T. harzianum* في منطقة الجذور فإنها تنتج أحماضا عضوية مثل Gluconic acid و Citric acid و Fumaric acid، و التى تخفض حموضة الوسط (التربة) وتسمح بذوبان الفوسفات و المواد المغذية و المعادن مثل الحديد و

المنغنيز، التي يتغذى عليها النبات، مما يساعد على النمو الجيد للنبات وبالتالي قدرته على المقاومة (Harman و آخرون، 2004؛ Benitez و آخرون، 2004).

6-2-4 - إنتاج المضادات الحيوية:

إضافة إلى الآليات السابقة، فإنه توجد طريقة أخرى والتي من خلالها يؤثر فطر *Trichoderma* على الفطريات الممرضة، وهي إنتاج مجموعة من المضادات الحيوية. وتتمثل في Harzianolide و T39 butenolide و Harzianopyridone، Trichorzianines (Vinale وآخرون، 2008؛ Emma وآخرون، 2008). قسم كل من Ghisalberti و Sivasithamparam (1991) المضادات الحيوية التي ينتجها هذا الفطر إلى ثلاث مجموعات وهي: مضادات حيوية طيارة مثل 6-pentyl-α-pyrone ومعظم مشتقات Isocyanide. مواد قابلة للذوبان في الماء مثل: Heptelidic acid و Koningic acid و Nonanoic acid. هذا الأخير يثبط انتاش أبواغ الفطرين *Crinipellis perniciosa* و *Moniliophthora roreri* (Aneja وآخرون، 2005). و Peptaibols الذي يثبط الإنزيم ß-glucan synthase لدى الفطر العائل (Vinale وآخرون، 2008). حيث تتداخل هذه المضادات الحيوية مع فوسفوليبيدات الغشاء البلازمي، و بالتالي تغيير المبادلات مع الوسط الخارجي، كما أن لها دورا في استحداث مقاومة النبات (Verma وآخرون، 2007).

6-3- المكافحة البيولوجية باستعمال الخمائر:

الخمائر فطريات وحيدة الخلية، واسعة الانتشار في الطبيعة، حيث عزلت من بيئات مختلفة (الماء والهواء والتربة). و بالرغم من وجود خمائر ممرضة، فإنه توجد أنواع أخرى ذات أهمية معتبرة، وهي تدخل في الصناعة الغذائية، حيث تنتج العديد من الإنزيمات والفيتامينات. كما أن البعض الآخر منها يستعمل في المكافحة البيولوجية (Laitila وآخرون، 2006؛ El-Tarabily و Sivasithamparam، 2006). وذلك لانتشارها الواسع على سطح النباتات، و بقائها لمدة طويلة في ظروف بيئية مختلفة، و قدرتها على التنافس وإنتاج المضادات الحيوية، بالإضافة لكونها ذات تغذية بسيطة. وعلى العموم فإن معظم الخمائر المستعملة في المكافحة البيولوجية قد تم عزلها من الأجزاء الهوائية للنباتات (الأزهار والفواكه) والتربة (El-Tarabily و Sivasithamparam، 2006؛ Wilson و Wisniewski، 1989). وهناك العديد من الخمائر المستعملة في المكافحة البيولوجية للفطريات الممرضة للنباتات (جدول 2).

6-4- آليات المكافحة البيولوجية لدى الخمائر:

تستخدم الخمائر في مكافحتها للفطريات آليات مختلفة تتمثل في التنافس على المكان والغذاء، إنتاج السموم القاتلة، إنتاج المضادات الحيوية، والتطفل الفطري، وإنتاج الإنزيمات المحللة.

6-4-1- السموم القاتلة (Killer toxin):

وهي عبارة عن بروتينات أو غليكوبروتينات ذات وزن جزيئي منخفض. وقد اكتشفت لأول مرة عند خميرة *Saccharomyces cerevisiae* حيث تفرز مجموعة البروتينات القاتلة (Protein killers) وهي: K_1، K_2، K_3، و K_{28} والتي تقتل العزلات الأخرى التابعة لنفس النوع (El-Tarabily و Sivasithamparam، 2006). في البداية كان يعتقد أن هذه السموم القاتلة تقتل الخمائر التي تنتمي لنفس النوع فقط، بعدها وجد أنها تؤثر على البكتيريا

وحتى الفطريات (Walker وآخرون، 1995؛ Izgu و Altinbay، 1997؛ El-Tarabily و Sivasithamparam، 2004). من الخمائر المنتجة للسموم القاتلة: *Pichia anomala* (Fredlund وآخرون، 2002)، *Debaryomyces* و *Candida*، *Klyveromyces* (Rosini وآخرون، 1983). حيث تؤثر هذه السموم على الغشاء الخلوي للعائل، وذلك بتشكيل قنوات عبر الغشاء، مما يتسبب في تسرب الأيونات، توقيف الانقسام الخلوي وذلك بإعاقة تضاعف DNA، بالإضافة إلى تنشيط إنزيم β-1,3-glucanase وبالتالي تثبيط بنائه (Izgu وآخرون، 2006؛ Chi وآخرون، 2010).

6-4-2- التنافس على المكان والغذاء:

بينت العديد من الدراسات ظاهرة التنافس بين الخمائر والفطريات. وقد أظهر هذا مجهريا، حيث يحدث انجذاب للخمائر إلى سطح هيفات الفطر المستهدف أين تشكل كتلا عليه (Mercier و Wilson، 1994؛ Arras وآخرون، 1998). ويكون التنافس على المكان من خلال التنافس على موضع الإصابة، حيث أن كل من *P. guilliermondii* و *Candida oleophila* تتموضعان على موقع الإصابة الناتجة عن الفطر *Botrytis cinerea* وبالتالي استبعاد الفطر الممرض وإزاحته (Wisniewski وآخرون، 1991؛ Mercier و Wilson، 1994). تحدث هذه الظاهرة في الطبيعة عندما تتواجد قطرات سكرية على سطح الفواكه، حيث تجذب كل من الخمائر والفطريات الممرضة وهنا يحدث التنافس فيما بينهما، وكذلك في منطقة الجذور (El-Tarabily، 2004).

جدول2 :بعض الخمائر المستعملة في المكافحة البيولوجية للفطريات.

الخميرة	الفطر	المرجع
Cryptococcus laurentii *Trichosporon pullulans*	*Penicillium expansum*	Yao وآخرون،2004
Debaryomyces hansenii	*Penicillium italicum*	Hernández-Montiel وآخرون، 2010
Pichia guilliermondii، *Candida musae*، *Issatchenkia orientalis*	*Colletotrichum capsici*	Chanchaichaovivat وآخرون، 2007
Rhodotorula glutinis	*Botrytis cinerea*	Sansone وآخرون، 2005
Saccharomyces cerevisiae	*F. verticillioides* *F. solani* *Cladosporium sp* *Rhizoctonia solani*	Elwakil وآخرون، 2009
Pichia anomala	*Penicillium roqueforti*	Druvefors وآخرون، 2002
Debaryomyces hansenii	*Aspergillus sp* *Cladosporium sp* *Penicillium roqueforti* *Eurotium chevalieri*	Liu و Tsao، 2009
Pichia anomala	*Penicillium verrucosum*	Mokiou و Magan 2008

6-4-3- إنتاج المضادات الحيوية:

بينت العديد من الدراسات أن الخمائر تنتج المضادات الحيوية في مكافحتها للفطريات، في حين لا توجد معلومات كثيرة حول طبيعة هذه المواد وتركيبها (El-Tarabily و Sivasithamparam، 2006). وقد أثبت ذلك عند تنمية كل من الفطر الخميرة على نفس طبق بتري ، حيث لوحظ تثبيط لنمو الفطر بدون وجود احتكاك فيزيائي. وكذلك عند دراسة تأثير رشاحة الخميرة على نمو وانتاش أبواغ الفطريات (Walker وآخرون، 1995؛ Spadaro وآخرون، 2002؛ Liu و Tsao، 2009).

6-4-4- **التطفل**:

يعتبر التطفل الفطري من أهم الآليات التي تستخدمها الخمائر في مكافحة الفطريات. حيث لوحظ التصاق خلايا الخميرة على سطح هيفا الفطر من طرف العديد من الباحثين (Castoria وآخرون، 1997؛ Arras وآخرون، 1998؛ Widyastuti، 2008). كذلك عند زرع كل من *P. anomala* و *Botryodiplodia theobromae* على نفس الوسط (PDA) ، لوحظ التصاق الخميرة على سطح هيفا الفطر مشكلة طبقة كثيفة حوله، تعيق وصول المواد الغذائية للفطر، وكذلك منع وصول إنزيمات الفطر إلى الوسط الخارجي. إضافة إلى هذا فتواجدها على سطح الفطر ينتج عنه حدوث تقعرات على سطح الهيفا مشكلة أضرارا عليه (Hashem و Alamri ، 2009).

6-4-5- إنتاج الإنزيمات المحللة:

وجد أن الخمائر *P. anomala* ، *Rhodotorula glutinis*، *P. membranifaciens* ، *C. oleophila*، و *D. hansenii* تنتج مجموعة من الإنزيمات المحللة، وتتمثل في β-1,3 glucanase، و Lipase، و Protease ، و Chitinase (Castoria وآخرون، 1997؛ Masih و Paul، 2002 ؛ El-Tarabily و Sivasithamparam،

2006؛ Bolumar وآخرون، 2008). تعمل هذه الإنزيمات على تحليل الجدار الخلوي الفطريات. وجد Bar-Shimon (2004) أن إنتاج هذه الإنزيمات من طرف *C. oleophila* يزداد عند إضافة قطع من الغشاء الخلوي لـ *P. digitatum* في الوسط، حيث أنها تعيق انتاش الأبواغ وتحد من استطالة الهيفا.

الملخص:

تم عزل مجموعة من الفطريات تنتمي أساسا إلى الأجناس *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium*. بينت نتائج العزل أن أن الفطر السائد في العينة الأولى هو (سطيف) داخليا وخارجيا *Fusarium* (58.47%) و(54.25%) على الترتيب، في حين كانت السيادة لفطر *Aspergillus* في العينة الثانية داخليا وخارجيا (53.43%) (40%) على الترتيب. كما تم عزل فطريات أخرى مثل: *Cladosporium*، *Rhisopus*، *Basiptospora*، و*Alternaria*، و *Ovilariopsis*. من خلال الدراسة الفسيولوجية لفطر *F. moniliforme*، وجد أن نموه يكون مثاليا عند درجة الحرارة 25°م، وعلى وسط PDA. وينمو الفطر جيدا عند الرطوبة النسبية (95%)، ودرجة الأس الهيدروجيني (pH = 5). وفي وجود الغلوكوزكمصدر للكربون و KNO_3 كمصدر للأزوت. وجد أيضا أن *F. moniliforme* ينتج مجموعة من المستقلبات الثانوية، حيث تم التعرف على سم T_2-toxin. بينت تجارب المكافحة البيولوجية أن فطر *Trichoderma harzianum* له القدرة على تثبيط نمو الفطر بآليات مختلفة، كالتطفل الفطري، وإنتاج المواد الأيضية الطيارة، والمواد غير الطيارة. كما وجد أيضا أن خميرة *Debaryomyces hansenii* تثبط نمو الفطر، و لها القدرة على إفراز مواد طيارة. وعند اختبار تأثير هذه الخميرة على الفطر في المخازن المصغرة، وجد أنها تعيق نمو الفطر. وقدر تأثيرها على الفطر بدرجة تثبيط (++).

كلمات مفتاحية: الذرة، *F. moniliforme*، السموم الفطرية، المكافحة البيولوجية.

الملخص:

تم عزل مجموعة من الفطريات تنتمي أساسا إلى الأجناس *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium*. بينت نتائج العزل أن أن الفطر السائد في العينة الأولى هو (سطيف) داخليا وخارجيا *Fusarium* (58.47%) و(54.25%) على الترتيب، في حين كانت السيادة لفطر *Aspergillus* في العينة الثانية داخليا وخارجيا (53.43%) (40%) على الترتيب. كما تم عزل فطريات أخرى مثل: *Cladosporium*، *Rhisopus*، *Basiptospora*، و*Alternaria*، و *Ovilariopsis*. من خلال الدراسة الفسيولوجية لفطر *F. moniliforme*، وجد أن نموه يكون مثاليا عند درجة الحرارة 25°م، وعلى وسط PDA. وينمو الفطر جيدا عند الرطوبة النسبية (95%)، ودرجة الأس الهيدروجيني (pH = 5). وفي وجود الغلوكوزكمصدر للكربون و KNO_3 كمصدر للأزوت. وجد أيضا أن *F. moniliforme* ينتج مجموعة من المستقلبات الثانوية، حيث تم التعرف على سم T_2-toxin. بينت تجارب المكافحة البيولوجية أن فطر *Trichoderma harzianum* له القدرة على تثبيط نمو الفطر بآليات مختلفة، كالتطفل الفطري، وإنتاج المواد الأيضية الطيارة، والمواد غير الطيارة. كما وجد أيضا أن خميرة *Debaryomyces hansenii* تثبط نمو الفطر، و لها القدرة على إفراز مواد طيارة. وعند اختبار تأثير هذه الخميرة على الفطر في المخازن المصغرة، وجد أنها تعيق نمو الفطر. وقدر تأثيرها على الفطر بدرجة تثبيط (++).

كلمات مفتاحية: الذرة، *F. moniliforme*، السموم الفطرية، المكافحة البيولوجية.

Summary:

The isolation and identification of mycoflora from maize seeds showed the sovereignty of three fungi belong to *Aspergillus*, *Fusarium* , and *Penicillium.* For the first simple (Setif), the genus *Fusarium* was the predominant in internal and external mycoflora (58.47, 54.25%), while *Aspergillus* was the predominant in the second simple (Algeriers)(53.43, 40%). Other fungi such as *Cladosporium, Alternaria, Rhisopus, Basiptospora, Ovilariopsis* were isolated. The physiological study *of F. moniliforme* showed that, this fungus grow well in PDA, at 25°C, pH=5, and in 95% of relative humidity, in the presence of glucose and KNO_3 as carbon and nitrogen sources. It was found that this fungus produces several secondary metabolites, T_2 -toxin was the only toxin identified. The biological control of *F. moniliforme* by *Trichoderma harzianum* showed that, this later can inhibit the growth of *F. moniliforme* by different mechanisms such as mycoparasitism, and the production of volatile and non volatile compounds. *Debaryomyces hansenii* can reduce the growth of *F. moniliforme* in dual culture, by the production of volatile compounds. When testing the impact of the yeast on the growth of the fungus in mini silo, it was found that, the degree of mould inhibition was classified in "inhibition"(++).

Keywords: Zea mays, F. moniliforme, mycotoxins, biological control.