الأثر التضادي لعزلة محلية من فطر *Trichoderma harzianum* إزاء البكتيريا المسببة لمرض سل الزيتون في سورية

رواد علي أحمد[1]*، موسى السمارة[1]، ابراهيم العبيد[2] وإياد محمد[3]

(1) قسم الوقاية البيئية، المعهد العالي لبحوث البيئة، جامعة اللاذقية، سورية؛ (2) قسم وقاية النبات، كلية الهندسة الزراعية، جامعة اللاذقية، سورية؛ (3) قسم وقاية النبات، وزارة الزراعة، دمشق، سورية.

*البريد الإلكتروني للباحث المراسل: rawad.ahmad899@gmail.com

الملخص

أحمد، رواد علي، موسى السمارة، ابراهيم العبيد وإياد محمد. 2026. الأثر التضادي لعزلة محلية من فطر *Trichoderma harzianum* إزاء البكتيريا المسببة لمرض سل الزيتون في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 44(1):40–47. https://doi.org/10.22268/AJPP-001373

يعدّ مرض سلّ الزيتون من أهم الأمراض التي تصيب شجرة الزيتون والذي يتسبب عن البكتيريا *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Pss*). هدف هذا البحث إلى اختبار كفاءة التأثير التضادي لعدة مستخلصات عزلة تجارية للفطر *Trichoderma harzianum* واختبار فعالية التأثير المباشر لهذا الفطر في تثبيط نمو البكتيريا *Pss*. عزلت البكتيريا الممرضة من التدرنات الموجودة على أشجار الزيتون المصابة في منطقة القدموس (محافظة طرطوس، سورية). تم اختبار التأثير التضادي للمستخلصات المختلفة لعزلة الفطر *Trichoderma harzianum* إزاء البكتيريا *Pss* مختبرياً بطريقة الأقراص الورقية التي تعتمد على وضع أقراص ورقية بتراكيز محددة من المستخلصات (خلات الإيتيل، الهكسان والمستخلص الأنزيمي BIO-TH-WP) للفطر على سطح الوسط الغذائي (NA) الذي نشرت عليه العزلة البكتيرية على شكل مرجة، وحضنت عند درجة حرارة 28±2°س لمدة 48 ساعة، وبعدها تمّ قياس النسبة المئوية لتثبيط نمو البكتيريا الممرضة. بلغت نسبة التثبيط 0.0، 33.3 و 17.7% لكل من مستخلصات الهكسان، خلات الإيتيل، المستخلص الأنزيمي BIO-TH-WP للفطر *Trichoderma harzianum*، على التوالي. أدى استخدام المستخلصات على غراس زيتون بعمر سنتين إلى تخفيض معامل الإصابة بالمرض، وترافق ذلك مع ازدياد تركيز أنزيمي البيروكسيداز والبولي فينول أوكسيداز وذلك بعد الرش بالمستخلص الأنزيميBIO-TH-WP للفطر *Trichoderma harzianum* بعد 90 و 105 يوماً من العدوى بالبكتيريا الممرضة. أظهرت نتائج هذا البحث أن مستخلص خلات الإيتيل، والمستخلص الأنزيمي BIO-TH-WP عنصران مهمان يمكن استخدامهما في المستقبل في مكافحة البكتيريا المسببة لمرض سل الزيتون.

كلمات مفتاحية: خلات الايتيل، *Trichoderma harzianum*، مكافحة حيوية، مرض سل الزيتون، مستخلصات فطرية.

المقدمة

يعدّ مرض سلّ الزيتون من الأمراض المحجورة لصعوبة معالجته، وينتشر بشكل كبير في الساحل السوري وقد تراوحت نسبة الإصابة به في حدود 0–100% في المنطقة الساحلية، وشدة الإصابة في حدود 7–90%، وتتغير المساحات وعدد الأشجار المصابة بتغير الظروف المناخية (عيسى، 2010). يتسبب المرض عن البكتيريا *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* حيث تظهر الأعراض بصورة أورام (تدرنات)، على الأفرع والسوق والأوراق، وقد تتسبب في حالة الإصابة الشديدة بموت الأفرع وجفاف الشجرة بالكامل (Ramos *et al.*, 2012). يمكن للبكتيريا التنقل والحركة داخل كافة أجزاء النبات الخضرية والتسبب بظهور أورام ثانوية، ولا يوجد صنف أو نوع من أنواع الزيتون منيع ضدّ الإصابة بمرض سل الزيتون (Penyalver *et al.*, 2006). لقد استخدمت عدة مركبات كيميائية لمكافحة هذا المرض ومن ضمنها المركبات النحاسية، ولكن استخدام المبيدات الكيميائية يؤثر في الأمن البيئي والغذائي وقد يتسبب بأمراض للإنسان (Li *et al.*, 2017)، كما يكسب المسببات المرضية مقاومة ضدّ هذه المواد، ومع استمرار استخدامها يصبح من الصعب السيطرة عليها، إضافةً إلى الأثر التراكمي والمتبقي لهذه المبيدات (Hawkins *et al.*, 2019). لذلك كان لا بد من التوجه إلى المكافحة الحيوية التي توفر بديلاً آمناً للتحكم في مسببات الأمراض البكتيرية للنباتات حيث ينتج فطر التريكوديرما (*Trichoderma*) مستقلبات ثانوية (Longibrachiatum peptaibol، Trichogin GAIV)، لها نشاط مضاد للبكتيريا *Xanthomonas arboricola*، *Pseudomonas corrugata*، *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*، *Ralstonia solanacearum*، *Erwinia carotovora*

https://doi.org/10.22268/AJPP-001373
© 2026 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

subsp. *carotovora*, و *Bacillus subtilis*. وكذلك ضد الفطور الخيطية والخميرة (Caracciolo *et al*., 2023).

تعدّ فطور الجنس *Trichoderma* إحدى أهم عوامل المكافحة الحيوية ضدّ مسببات الأمراض النباتية، حيث تعتمد على الآليات الرئيسية للسيطرة على مسببات الأمراض كالتطفل، والتضاد، وإنتاج المستقلبات الثانوية، وتحريض المقاومة لدى النبات، والتنافس على الموارد، والسيطرة على الموقع، وتحمل الإجهاد (Guzman *et al*., 2023). وتظهر تأثيرات الفطر *Trichoderma harzianum* في النباتات بالمقاومة الموضعية المستحثة، حيث يستعمر نمو الفطر البشرة الجذرية، وطبقات القشرة الخارجية، وتتحرر الجزيئات النشطة حيوياً، وتحرض مسارات المقاومة في النباتات، فتسبب زيادة نمو النبات، وامتصاص المغذيات، وتنتج مزيجاً غنياً من الإنزيمات المضادة للفطور، كالكيتينازات، 1 - 3 جلوكاناز. وتكون هذه الإنزيمات متآزرة مع بعضها بعضاً (Harman, 2006).

أدى استخدام الفطر *Trichoderma harzianum* إلى تراكم حمض الساليسيليك، والجاسمونيك في النبات مما يثبت فعاليته في المكافحة الحيوية داخل النبات (Waqas *et al*., 2015)، ويتيح وجود عوامل المكافحة الحيوية في النظام البيئي وإمكانية استخدامها كبديل آمن للمبيدات (Silva *et al*., 2019). وقد أثبت مستخلص خلات الإيتيل لفطر *Trichoderma harzianum* فعاليته وقدرته على تثبيط إنتاج الأفلاتوكسين، وهي مجموعة من مركبات البوليكيتيد شديدة السمية والمطفرة والمسرطنة تنتجها سلالات معينة من الفطر *Aspergillus flavus* IMI، *A. pseudotamarii*، *A. tamarii*، *A. nomius*، *A. parasiticus* و *A. bombycis* (Jantarach & Thanaboripat, 2010).

لذلك هدف هذا البحث إلى تقييم كفاءة التأثير التضادي لكل من مستخلصات خلات الإيتيل والهكسان والمستخلص الإنزيمي BIO- TH-WP للعزلة المحلية من الفطر *Trichoderma harzianum* إزاء البكتيريا *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* المسببة لمرض سلّ الزيتون مختبرياً، واختبار فعاليتها على غراس زيتون بعد إحداث العدوى الاصطناعية بالمرض وتقدير فعاليتها في زيادة نشاط الأنزيمات الدفاعية (البيروكسيداز، البولي فينول أوكسيداز).

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات وعزل البكتيريا المسببة لمرض سلّ الزيتون

جمعت عدة عينات (10 تدرنات) حديثة النمو من خمس أشجار زيتون مصابة من الصنف الخضيري في فصل الربيع من منطقة القدموس بمحافظة طرطوس في سورية. تم عزل ثلاث عزلات للبكتيريا الممرضة من أشجار الزيتون المصابة، بنزع الأورام أو التدرنات من الأشجار المصابة وتقطيعها إلى قطع صغيرة بعد إجراء التعقيم السطحي بمادة هيبوكلوريت الصوديوم التجاري بتركيز 5% لمدة 3–5 دقائق، ثم بالكحول 75% لمدة دقيقة واحدة، ثم غسلت بالماء المقطر والمعقم، ووضعت على ورقة ترشيح معقمة لتجف. تمّ هرس 1.7 غ من النسيج المقطع في 5 مل ماء مقطر ومعقم، وبعد 15 دقيقة نشرت قطرة من المعلق على سطح الآجار المغذي ثم حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 28±2°س لمدة 48 ساعة (أبو غرة، 2004).

تحديد البكتيريا الممرضة المسببة لمرض سلّ الزيتون

نُمّطت ثلاث عزلات بكتيرية اعتماداً على الخصائص المزرعية (صفات المستعمرات)، صبغة غرام، بالاضافة إلى الاختبارات الكيميائية الحيوية (اختبار التنفس، اختبار اللوفان، اختبار القدرة على تحلل البكتين)، والفحص المجهري (العبدالله وأبو غرة، 2019).

تحضير اللقاح البكتيري للعزلة البكتيرية

تمّ تنشيط العزلة البكتيرية قبل إجراء اختبار التأثير التضادي لفطر *Trichoderma harzianum* على وسط الآغار المغذي (Nutrient agar) عند درجة حرارة 28±2°س لمدة 48 ساعة، وأخذ عدة مستعمرات من البكتيريا المنشطة على الوسط المغذي وتمّ مزجها بالماء المقطر المعقم بحيث يكون عدد الخلايا الكلي بحدود 10^7 وحدة مشكلة للمستعمرة البكتيرية/مل تقريباً، وذلك عن طريق قياس الكثافة الضوئية باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند طول الموجة 600 نانومتر (OD_{600}= 2). (عيسى، 2010).

عزلة الفطر المضاد *Trichoderma harzianum*

تمّ الحصول على العزلة المحلية للفطر *Trichoderma harzianum* وتنميتها على وسط Potato dextrose agar (PDA) عند درجة حرارة الغرفة لمدة 7 أيام، كما تمّ الحصول على المستخلص التجاري (مستخلص أنزيمي جاهز BIO- TH-WP) الذي يحتوي على أبواغ الفطر بتركيز 10^7 بوغة/مل مع كافة الأنزيمات التي ينتجها الفطر وذلك من دائرة المكافحة الحيوية في مديرية الزراعة، محافظة حماه (سورية). تم الحصول على أبواغ الفطر *Trichoderma harzianum* بالاستخلاص بالهكسان، وخلات الإيتيل للفطر النامي على بيئة PDA بعمر أسبوع، وبعد الترشيح للتخلص من الميسليوم، تم تقدير عدد الأبواغ التي أنتجها الفطر بواسطة شريحة العدّ (hemacytometer) بعد أن تمّ التمديد للحصول على المعلق البوغي ذي التركيز 10^7 بوغة/مل (غانم وآخرون، 2018).

اختبار كفاءة التضاد بين العزلة الفطرية والبكتيريا الممرضة

تمت تنمية الفطر *Trichoderma harzianum* على الوسط المغذي Potato Dextrose Agar (PDA) في ظروف درجة حرارة الغرفة العادية لمدة سبعة أيام، ثم أخذ جزء من المستعمرة الفطرية بشكل قرص بقطر 7 مم ووضع على طبق بتري يحتوي الوسط المغذي (PDA)، وتمت زراعة البكتيريا على ثلاثة خطوط في نفس الطبق على بعد 3 سم عن قرص الفطر، وتم التحضين عند درجة حرارة 28±2°س، وتمت ملاحظة التأثير المباشر للفطر على نمو البكتيريا وتم إنهاء التجربة عند وصول نمو الفطر الى حافة الطبق في تجربة الشاهد.

أُخذ جزء من المستعمرة البكتيرية حديثة النمو(24 ساعة) بوساطة إبرة التلقيح البكتيري، ومزجت مع 5 مل ماء، ثم أخذ 100 ميكروليتر من المعلق البكتيري ونشرت على كامل سطح طبق بتري لعمل مرج يحتوي المستنبت الغذائي (Nutrient Agar)، ثم تمت إضافة 5 ميكروليتر من كل مستخلص (معلق بوغي) (تركيز 100%) إلى الأقراص الورقية المعقمة مسبقاً ذات القطر 5 مم، وطبقت ثلاثة مكررات لكل معاملة، بينما عوملت أقراص الشاهد بالماء المقطر المعقم (Fernandes & Marcelo, 2008)، ثم حضنت الأطباق لمدة 24–28 ساعة عند درجة حرارة 28±2°س، وبعدها تم قياس قطر النمو البكتيري بمسطرة ميليمترية، وحسبت النسبة المئوية للتثبيط وفق المعادلة التالية (Bouaichi *et al*., 2015):

$$\text{نسبة التثبيط \%} = \frac{\text{متوسط قطر النمو البكتيري للشاهد} - \text{متوسط قطر النمو البكتيري للمعاملة}}{\text{متوسط قطر النمو البكتيري للشاهد}} \times 100$$

تحريض المقاومة الجهازية المكتسبة وتقدير شدة الإصابة على الغراس

تم تنفيذ العمل نصف الحقلي في مزرعة زيتون للموسم 2020–2021 على غراس زيتون بعمر سنتين من الصنف الخضيري، مزروعة في أكياس بلاستيكية تحتوي على مزيج تربة وتوربة بنسبة 1:2. تم استخدام فطر *Trichoderma harzianum* بطريقة الرش على المجموع الخضري، بتركيز 150 مغ/مل معلق بوغي للفطر (غانم وآخرون، 2018)، قبل أسبوعين من إحداث العدوى بالبكتيريا المسببة لمرض سلّ الزيتون لدراسة مقدرة هذه المستخلصات على تحفيز مقاومة الغراس لمرض سلّ الزيتون، واستخدام المعلق البكتيري فقط لمعاملة غراس الشاهد. أجري اختبار القدرة الإمراضية وذلك بوضع 20 ميكروليتر من المعلق البكتيري ذي التركيز 10^7 وحدة مشكلة للمستعمرة البكتيرية/مل، أُخذ من مزرعة بكتيرية عمرها 24 ساعة على عشرة جروح أجريت بواسطة مشرط معقم على أفرع بعمر سنة لغراس ضمن أكياس، ثم غطيت الغراس المعداة بأكياس البولي إيتيلين لمدة 48 ساعة لتأمين الرطوبة المناسبة لإحداث العدوى بالبكتيريا الممرضة. أما في معاملة الشاهد، فقد تمت معاملة الغراس بالبكتيريا فقط وذلك بحقن 20 ميكروليتر بالمعلق البكتيري، وتم استخدام أوكسي كلورايد النحاس كمبيد قياسي. لم يستخدم المضاد الحيوي تتراسكلين في التجارب على الغراس لكون استخدامه ممنوعاً، وتم استخدامه مختبرياً فقط، وذلك خلال شهر آذار/مارس من عام 2022. تم تسجيل متوسط درجة حرارة 23°س ورطوبة نسبية 63% في الحقل. تم تسجيل موعد ظهور الأعراض بعد مرور ثمانية أسابيع، وتم بعد ذلك قياس تركيز أنزيمات المقاومة الجهازية (البيروكسيداز، والبولي فينول أوكسيداز) (Zucchini *et al*., 2023). لحساب معامل الإصابة (Disease index)، جمعت الدرنات المتشكلة على كل غرسة مصابة، ووضع سلم تقييس شدة الإصابة 0–9 وفق ما يلي: 0= لا توجد إصابة، 1= عدد الدرنات على الغرسة 1–6 درنة، 2= عدد الدرنات على الغرسة 7–12 درنة، 3= عدد الدرنات على الغرسة 13–18 درنة، 4= عدد الدرنات على الغرسة 19–24 درنة، 5 = عدد الدرنات على الغرسة 25–30 درنة، 6= عدد الدرنات على الغرسة بين 31–36 درنة، 7= عدد الدرنات على الغرسة 37–42 درنة، 8= عدد الدرنات على الغرسة 43–48 درنة، 9= مجموع عدد الدرنات على الغرسة أكثر من 48 درنة) (Pyrowolakis & Weltzien, 1974)، وتم تقدير معامل الإصابة للغراس، وفي التجربة النصف حقلية وفق المعادلة التالية:

$$\text{معامل الإصابة (\%)} = \frac{\text{مجموع ناتج ضرب عدد الغراس المصابة بالدرجة الموافقة من السلم}}{\text{عدد الأشجار الكلية} \times \text{أعلى درجة في السلم وهي 9}} \times 100$$

تقدير نشاط أنزيم البيروكسيداز

اعتماداً على طريقة (Hammerschmidt *et al*., 1982)، تمّ تقدير نشاط أنزيم البيروكسيداز بأخذ 200 مغ من أجزاء خضرية (أوراق) لكل معاملة وسحقت في 2 مل من محلول فوسفاتي منظم درجة حموضته 7.0 (0.1 مول)، ووضعت ضمن جفنة بورسلان وطحنت بالهاون، ثم وضع الناتج ضمن أنبوب سعته 1.5 مل ثم ثفلت لمدة 10 دقائق بسرعة 1500 دورة/دقيقة عند درجة حرارة 4°س. تم استخدام المادة الطافية كمصدر للأنزيم ليتم بعدها وضع المزيج في جهاز الطرد المركزي بسرعة 16000 دورة/دقيقة عند درجة حرارة 4°س لمدة 15 دقيقة. تم قياس نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد إضافة 1.5 مل Pyrogallol (0.05 ميلي مولر) و0.5 مل من مستخلص الإنزيم و 0.5 مل من ماء الأوكسجين (1%). حضن المزيج عند درجة حرارة الغرفة 28°س ليتم بعدها قياس التغيرات في الامتصاص الضوئي عند موجة 420 نانومتر كل 30 ثانية لمدة 3 دقائق. قدر نشاط أنزيم البيروكسيداز بعدد ميكرومولات الماء الأوكسجيني التي تتفكك بواسطة 200 مغ من النسيج النباتي الداخل في تشكيل المستخلص الإنزيمي في الدقيقة الواحدة عند درجة حرارة 25°س،

وقُدر نشاط أنزيم البيروكسيداز وفق المعادلة التالية (Sadasivam & Manickam, 2008):

$$\text{نشاط انزيم البيروكسيداز (نانومول)} = \frac{\text{كمية الماء الأوكسيجيني بين الزمن الأولي والنهائي (النانومول)} \times \text{معامل تخفيف العينة}}{\text{الوقت النهائي (3 دقائق)} - \text{الوقت البدائي (0.5 دقيقة)} \times \text{حجم العينة}}$$

$$\text{تركيز أنزيم البيروكسيداز (نانومول)} = \frac{\text{القيمة العظمى للامتصاصية} - \text{قيمة الدنيا للامتصاصية}}{2.5}$$

تقدير نشاط أنزيم Polyphenoloxidase (PPO)

أخذ 200 ميكرو ليتر من المستخلص النباتي وأُضيف إليه 3.5 مل فوسفات البوتاسيوم تركيز 0.1 ميلي مول (6 pH) ومُزج مع 100 ميكروليتر من مادة Guaiacol 0.25% (مادة التفاعل) ثم وُضع المزيج في حمام مائي عند درجة حرارة 28–30°س لمدة 5 دقائق، ثم أُخذت القراءات بواسطة جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 470 نانومتر كل 30 ثانية لمدة دقيقتين (Flurkey, 1986).

التحليل الإحصائي

أجري تحليل التباين باتجاه واحد، بإستخدام برنامج Mini tab، وقورن ما بين المتوسطات بإستخدام اختبار أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 1% (اختبار Turkey)، وتضمنت كل معاملة ثلاثة مكررات وفي كل مكرر ثلاث غراس.

النتائج والمناقشة

تحديد البكتيريا الممرضة المختبرة

بينت نتائج عملية صبغة غرام والفحص المجهري أن جميع العزلات كانت بشكل مستعمرات بيضاء كريمية مسطحة لماعة كاملة الحواف أو متعرجة، والبكتيريا عصوية سالبة غرام، هوائية إجبارية، وسالبة لإختبار اللوفان، وسالبة لإختبار القدرة على تحلل البكتين.

التأثير التضادي بين الفطر المضاد والبكتيريا الممرضة بطريقة إنتشار القرص

أظهر فطر *Trichoderma harzianum* بمستخلصاته المختلفة (معلقات بوغية) تأثيراً على نمو البكتيريا ماعدا مستخلص الهكسان حيث كان نمو البكتيريا بوجود مستخلص الهكسان مماثلاً لنمو البكتيريا في طبق الشاهد، أما المستخلص الأنزيمي BIO-TH-WP فقد كانت نسبة تثبيطه 17.7% وقابلها 33.3%. في مستخلص خلات الايتيل. (جدول 1).

تشير نتائج هذا البحث إلى تأثير فطر *Trichoderma harzianum* في نمو البكتيريا المسببة لسلّ الزيتون، حيث أظهرت نتائج البحث أن مستخلص الهكسان لم يكن له أي تأثير في نمو البكتيريا الممرضة، بينما كان لمستخلص خلات الإيتيل، والمستخلص الأنزيمي BIO-TH-WP تأثيرٌ واضح في نمو البكتيريا مقارنةً بالشاهد. كذلك بينت التجارب أن نسبة التثبيط عند التركيز 0.002% للمضاد الحيوي تتراسكلين كانت 19%، وقابلها 23.3% في معاملة أوكسي كلور النحاس

التأثير التضادي المباشر للفطر المضاد *T. harzianum* إزاء البكتيريا الممرضة *P. savastanoi* pv. *savastanoi*

أظهرت النتائج أيضاً تأثيراً مباشراً للفطر *T. harzianum* في نمو البكتيريا الممرضة *P. savastanoi* pv. *savastanoi* المسببة لمرض سلّ الزيتون على الوسط PDA. بينت نتائج التحليل الاحصائي باستخدام اختبار Anova-one way (Tukey) وجود فروق معنوية بين المستخلصات المختلفة في تأثيرها على نمو البكتيريا مقارنةً مع الشاهد غير المعامل بفطر *T. harzianum*، إلا أنه لم يكن هناك فرق معنوي بين الشاهد ومستخلص الهكسان. بالمقابل، كان هناك فرق معنوي بين المستخلص الإنزيمي BIO-TH-WP ومستخلص خلات الإيتيل مقارنةً بالشاهد. وتتوافق هذه النتيجة مع عدد من الدراسات التي أظهرت أهمية الفطر *T. harzianum* كمضاد لنمو البكتيريا، حيث أظهرت الببتيدات المضادة للميكروبات (AMPs) المستخدمة كجزيئات فردية أو بشكل مختلط نشاطاً حيوياً ضد البكتيريا الممرضة *Erwinia amylovora* (Mendes *et al*., 2021a; 2021b)، وهي البكتيريا المسببة لمرض اللفحة النارية على التفاحيات، مما يشير إلى إمكانية استخدامها لمكافحة هذه البكتيريا (Spohn *et al*., 2019). كما أن القدرة المضادة لـ*T. harzianum* ناجمةٌ عن إطلاق فئة معينة من AMPs تسمى "Peptaibols" ، وتتميز بوجود عدة بقايا طبيعية غير مشفرة لحمض أمينيوبتيريك (Stoppacher *et al*., 2013). تجدر الإشارة إلى أنه تم تثبيط النوعين *Xanthomonas arboricola* و *Agrobacterium tumefaciens* بشكل جزئي عند استخدام الـPeptaibols بتركيز 3 ميكرومولر، بينما تم تثبيط النمو نهائياً عند التركيز 15 ميكرومولر (Caracciolo *et al*., 2023)، في حين تمّ تثبيط نمو البكتيريا المسببة لمرض سل الزيتون بنسبة 80% باستخدام كلا التركيزين. وقد تبين أيضاً أن البكتيريا *Pseudomonas corrugate* المسببة لمرض تماوت مرض لبّ ساق البندورة كانت أقل حساسية للببتيدات وتم تثبيط نموها بنسبة 20% فقط عند استخدام كلا التركيزين (Caracciolo *et al*., 2023).

جدول 1. التأثير التضادي لمستخلص الفطر المضاد *Trichoderma harzianum* إزاء البكتيريا الممرضة بطريقة إنتشار القرص.

Table 1. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* extract against pathogenic bacteria by disc diffusion method.

نسبة التثبيط (%) Inhibition rate (%)	متوسط قطر هالة التثبيط (سم) Average diameter of the halo of inhibition (cm)	Treatment المعاملة
0.0	0.0 a	شاهد (ماء مقطر ومعقم) Control (distilled and sterile water)
0.0	0.0 a	مستخلص الهكسان Hexane extract
17.7	1.6 b	مستحضر تجاري BIO-TH-WP Commercial Product
33.3	3.0 c	مستخلص خلات الايتيل Ethyl acetate extract
23.3	2.1 d	مبيد أوكسي كلور النحاس Pesticide copper oxychloride
19.0	1.71 b	المضاد الحيوي (تتراسكلين) Antibiotic (tetracycline)

القيم التي يتبعها نفس الأحرف في نفس العمود لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 1%.

Values followed by the same letters in the same column are not significantly different at P=0.01.

تقدير شدة الإصابة بالمرض على غراس الزيتون

بينت نتائج استخدام مستخلصات الفطر *T. harzianum* في خفض شدة الإصابة بمرض سل الزيتون على الغراس المعداة بشكل اصطناعي، حيث ساهمت المستخلصات المختلفة بتخفيض شدة الإصابة بمرض سلّ الزيتون بعد ثلاثة وخمسة أشهر من العدوى بالمعلق البكتيري للبكتيريا الممرضة، مقارنة مع غراس الشاهد غير المعدى، وغراس الشاهد المعامل بمبيد أوكسي كلوريد النحاس. بلغت شدة الإصابة على الغراس المعاملة بفطر *Trichoderma* 11% بعد ثلاثة أشهر، و 13% بعد خمسة أشهر من العدوى، بينما بلغت شدة الإصابة في الشاهد 33% بعد ثلاثة أشهر من العدوى، و 38% بعد خمسة أشهر من العدوى، وبلغت شدة الإصابة على الغراس بعد المعاملة بأوكسي كلوريد النحاس 25% بعد ثلاثة أشهر بينما أصبحت 28% بعد خمسة أشهر من العدوى (جدول 2).

تقدير نشاط أنزيم البيروكسيداز في غراس الزيتون المعاملة

أظهرت النتائج (جدول 3) تأثير مستخلص فطر التريكوديرما على زياد نشاط أنزيم البيروكسيداز على غراس الزيتون بعمر سنتين، بعد تسعين يوماً (0.1352 نانومول) ، وبعد 105 أيام (0.1384 نانومول) ، بينما في الشاهد القياسي المعامل بأوكسي كلوريد النحاس، بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز 0.07324 نانومول بعد تسعين يوماً من الرش، و0.08271 نانومول بعد مئة وخمسة أيام. بينما بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز في الشاهد غير المعامل بعد تسعين يوماً من الرش 0.04936 نانومول، و0.0552 نانومول بعد مئة وخمسة أيام. من المعروف أن لأنزيم البيروكسيداز القدرة على الحدّ من غزو مسببات الأمراض في أنسجة المضيف عن طريق تحفيز الارتباط المتبادل لمكونات جدار الخلية استجابةً لمحفزات مختلفة مثل الجرح (Almagro *et al*., 2009).

تقدير نشاط أنزيم الـ Polyphenoloxidase في غراس الزيتون المعاملة

إزداد تركيز نشاط أنزيم البولي فينول أوكسيداز في الغراس المعاملة بمستخلص فطر *Trichoderma* بعد 90 يوماً (0.0546 نانومول)، وبعد 105 أيام (0.06463 نانومول) ، بينما بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز في الشاهد القياسي المعامل بأوكسي كلور النحاس بعد 90 يوماً من الرش 0.02112 نانومول، وبعد 105 أيام بلغ 0.02351 نانومول. أما في الشاهد المعدي بالبكتريا وغير المعامل بالفطر فقد بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز 0.01072 نانومول بعد 90 يوماً من الرش ، و0.01086 نانومول بعد 105 أيام (جدول 3).

لقد أظهر مستخلصا خلات الإيتيل والمستخلص الأنزيمي BIO- TH-WP للفطر *Trichoderma harzianum* (معلقات بوغية) فعاليتهما في منع نمو البكتيريا المسببة لمرض سلّ الزيتون مخبرياً، وكان مستخلص خلات الإيتيل أكثر فعالية في تثبيط نمو البكتيريا الممرضة. وقد أظهرت دراسات حديثة فعالية مستخلص خلات الايتيل كمضاد للميكروبات (Ambarwati *et al*., 2020) وأثبت المستخلص الأنزيمي BIO-TH-WP للفطر *T. harzianum* فعاليته على غراس الزيتون في تثبيط نمو البكتيريا الممرضة. أدى استخدام مستخلصات الفطر إلى تخفيض شدة الاصابة بالمرض وزيادة نشاط أنزيمي البيروكسيداز والبولي فينول اوكسيداز.

جدول 2. متوسط معامل الإصابة (%) بسل الزيتون على الغراس المعاملة بفطر التريكوديرما.

Table 2. Average of olive knot disease index (%) on seedlings treated with *Trichoderma*.

بعد 5 أشهر % After 5 months %	بعد 3 أشهر % After 3 months %	Treatment المعاملة
13	11	فطر التريكوديرما *Trichoderma* fungus
28	25	مبيد أوكسي كلوريد النحاس pesticide (Copper oxychloride)
38	33	شاهد معدى بالبكتيريا وغير معامل بالفطر Control infected with bacteria but not with fungus

جدول 3. تركيز أنزيم البيروكسيداز Peroxidase (نانومول) في غراس الزيتون بعد المعاملات المختلفة.

Table 3. Peroxidase enzyme concentration (nmol) in olive seedlings after different treatments.

التركيز بعد 105 يوماً من العدوى (نانومول) Concentration after 105 days of infection (nmol)		التركيز بعد 90 يوماً من العدوى (نانومول) Concentration after 90 days of infection (nmol)			
أنزيم البولي فينول أوكسيداز Polyphenoloxidase	أنزيم البيروكسيداز Peroxidase	أنزيم البولي فينول أوكسيداز Polyphenoloxidase	أنزيم البيروكسيداز Peroxidase	Treatment	المعاملة
0.06463 a	0.1384 a	0.05406 a	0.1352 a	*Trichoderma* fungus	فطر التريكوديرما
0.01086 b	0.0552 b	0.01072 b	0.04936 b	Untreated control	شاهد غير معامل
0.02351 c	0.08271 c	0.02112 c	0.07324 c	Pesticide oxychloride copper	مبيد أوكسي كلوريد النحاس

القيم التي يتبعها نفس الأحرف في نفس العمود لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 1%.

Values followed by the same letters in the same column are not significantly different at P=0.01.

Abstract

Ahmad, R.A., M. Al-Samara, I. Alabid and E. Mohamed. 2026. The Antagonistic Effect of a Local Isolate of *Trichoderma harzianum* Against Olive Knot Disease in Syria. Arab Journal of Plant Protection, 44(1):40-47.
https://doi.org/10.22268/AJPP-001373

Olive knot disease is considered one of the most important diseases affecting olive trees in Syria. The disease is caused by the bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Pss*). The aim of this study is to test the efficiency of the antagonistic effect of several extracts (ethyl acetate, hexane, and the enzymatic extract BIO-TH-WP) of a commercial isolate of the fungus *Trichoderma harzianum* on nutrient agar (NA), and also to test the direct effect of the fungus *Trichoderma harzianum* on inhibiting the growth of the bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* grown on potato-dextrose-agar (PDA) medium. The pathogenic bacterium was isolated from infected olive trees in the Al-Kadmous area (Tartous Governorate, Syria). The antagonistic effect of different extracts of the fungus *Trichoderma harzianum* against the bacteria *Pss* was tested by the disk diffusion method. Paper disks were immersed in specific concentrations of the extracts (ethyl acetate, hexane, and enzymatic extract (BIO-TH-WP) of the fungus and placed on a *Pss* lawn and incubated at 28±2°C for 48 hours. Thereafter, the inhibition rate (%) of the pathogenic bacteria was measured. The results obtained showed that the inhibition rate reached 0.0, 33.3, 17.7% for the extracts hexane, ethyl acetate, and BIO-TH-WP, respectively. The use of the extracts on two year old trees led to a reduction of disease index associated with an increase in the concentration of the enzymes peroxidase and polyphenol oxidase, 90 and 105 days after spraying with the enzymatic extract (BIO-TH-WP). The results obtained showed that ethyl acetate extract and the enzymatic extract BIO-TH-WP can be considered as a potential natural source that can be used for controlling olive knot disease.

Keywords: Ethyl acetate, *Trichoderma harzianum*, olive knot disease, fungal extracts, biological control.

Affiliation of authors: *R.A. Ahmad[1*], M. Al-Samara[1], I. Alabid[2] and E. Mohamed[3]. (1) Environmental Protection Department, High Institute of Environmental research, Latakia University, Latakia, Syria; (2) Plant Protection Department, Faculty of Agricultural Engineering, Latakia University, Latakia, Syria; (3) Plant Protection Division, Ministry of Agriculture, Damascus, Syria. [*]Email address of the corresponding author: rawad.ahmad899@gmail.com*

المراجع

العبدالله، نائل ومحمود أبو غرة. 2019. انتشار مرض سل الزيتون الذي تسببه البكتيريا *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* في بعض المحافظات السورية. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، 35(2):1-16.

*[**Al-Abdullah, N. and M.Abu Ghorrah.** 2019. Spread of olive knot disease caused by the bacteria Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi in some regions of Syria. Damascus University Journal of Agricultural Sciences, 35(2):1-16.(In Arabic)]*

أبو غرة، محمود. 2004. تعريف البكتيريا *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* المعزولة من نبات الأس *Myrtus Communis* في سورية. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، 20: 175-189.

*[**Abu Ghurra, M.** 2004. Definition of bacteria pseudomonas savastanoi pv. savastanoi isolated from myrtle myrtus communis in Syria. Damascus University Journal of Agricultural Sciences, 20(1):175-179. (In Arabic)]*

غانم، سامر، محمد طويل وصباح المغربي. 2018. كفاءة حمض السالسيليك في مقاومة مرض عين الطاووس المتسبب عن الفطر *Spilocaea oleagina* على غراس الزيتون تحت ظروف العدوى الاصطناعية. مجلة وقاية النبات العربية، 36(3):207-212.

*[**Ghanem, S., M. Tawil and S. Al-Maghribi.** 2018. Efficiency of Salicylic Acid In the resistance of peacock eye disease inoculation conditions. Arab Journal of Plant Protection, 36(3): 207-212. (In Arabic)]*

عيسى، سامر. 2010. دراسة انتشار مرض سل الزيتون *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* على العوائل الطبيعية، وتقييم بعض أصناف الزيتون اتجاه الإصابة. أطروحة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة دمشق. 60 صفحة.

*[**Issa, S.** 2010. Study of the spread of olive knot disaese Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi on natural*

References

Li, Z. and A. Jennings. 2017. Worldwide regulations of standard values of pesticides for human health risk control: A review. International Journal of Environmental Research and Public Health, 14(7):826. https://doi.org/10.3390/ijerph14070826

Mendes, R.J., L. Regalado, J.P. Luz, N. Tassi, C. Teixeira, P. Gomes, F. Tavares and C. Santos. 2021a. *In vitro* evaluation of five antimicrobial peptides against the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Biomolecules, 11:554. https://doi.org/10.3390/biom11040554

Mendes, R.J., S. Sario, J.P. Luz, N. Tassi, C. Teixeira, P. Gomes, F. Tavares and C. Santos. 2021b. Evaluation of three antimicrobial peptide mixtures to control the phytopathogen responsible for fire blight disease. Plants, 10(12):2637. https://doi.org/10.3390/plants10122637

Penyalver, R., A. García, A. Ferrer, E. Bertolini, J.M. Quesada, C.L. Salcedo, J. Piquer, J. Pérez-Panadés, E.A. Carbonell, C. del Río, J.M. Caballero and M.M. López. 2006. Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and their use for evaluation of olive cultivar susceptibility. Phytopathology, 96(3):313-319. https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0313

Pyrowolakis, E. and H.C. Weltzien. 1974. Studies on the distribution of olive knot, induced by *Pseudomonas savastanoi* in the Greek island of Crete. Phytopathologia Mediterranea, 13:118-120.

Ramos, C., I.M.M. Casado, L. Bardaji and I.M. Aragón. 2012. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: Some like it knot. Molecular Plant Pathology, 13(9):998-1009. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00816.x

Sadasivam, S. and A. Manickam. 2008. Biochemical Methods. New Delhi: New Age International Pvt. Ltd. 270 pp.

Silva, R.N., V.N. Monteiro, A.S. Steindorff, E.V. Gomes, E.F. Noronha and C.J. Ulhoa. 2019. *Trichoderma*–pathogen–plant interaction in pre-harvest food security. Fungal Biology, 123:565-583. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.06.010

Spohn, R., L. Daruka, V. Lázár, A. Martins, F. Vidovics, G. Grézal, O. Méhi, B. Kintses, M. Számel and P.K. Jangir. 2019. Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance. Nature Communications, 10:4538. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12364-6

Stoppacher, N., N.K.N. Neumann, L. Burgstaller, S. Zeilinger, T. Degenkolb, H. Brückner and R. Schuhmacher. 2013. The comprehensive peptaibiotics database. Chemistry and Biodiversity, 10(5):734-743. https://doi.org/10.1002/cbdv.201200427

Waqas, M., A.L. Khan, M. Hamayun, R. Shahzad, S.M. Kang, J.G. Kim and I.-J. Lee. 2015. Endophytic fungi promote plant growth and mitigate the adverse effects of stem rot: An example of *Penicillium citrinum* and *Aspergillus terreus*. Journal of Plant Interactions, 10(1):280-287. https://doi.org/10.1080/17429145.2015.1079743

hosts, and evaluation of some olive cultivars towards infection. M.Sc. thesis, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria. 60 pp. (In Arabic)].

Almagro, L., L.V. Gómez-Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. Ros-Barceló and M.A. Pedreño. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. Journal of Experimental Botany, 60(2):377-390 . https://doi.org/10.1093/jxb/ern277

Ambarwati, A., S. Wahyuono, S. Moeljopawiro and T. Yuwono. 2020. Antimicrobial activity of ethyl acetate extracts of *Streptomyces* sp. CRB46 and the prediction of their bioactive compounds chemical structure. Biodiversitas, 21(7):3380-3390.

Bouaichi, A., R. Benkirane, K. Habbadi, A. Benbouazza and E.H. Achbani. 2015. Antibacterial activities of the essential oils from medicinal plants against the growth of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causal agent of olive knot. Journal of Agriculture and Veterinary Science, 8(12):41-45. https://doi.org/10.9790/2380-081224145

Caracciolo, R., L. Sella, M. De Zotti, A. Bolzonello, M. Armellin, L. Trainotti, F. Favaron and S. Tundo. 2023. Efficacy of *Trichoderma longibrachiatum* trichogin GA IV peptaibol analogs against the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and other phytopathogenic bacteria. Microorganisms, 11(2):480. https://doi.org/10.3390/microorganisms11020480

Fernandes, A. and M. Marcelo. 2008. Evaluation of the sensitivity of *Pseudomonas savastanoi* to seventeen antibiotics. Acta Horticulturae, 791:565-568. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.791.87

Flurkey, W.H. 1986. Polyphenoloxidase in higher plants: Immunological detection and analysis of in vitro translation products. Plant Physiology, 81(2):614-618. https://doi.org/10.1104/pp.81.2.614

Guzmán-Guzmán, P., A. Kumar, S.D.L. Santos-Villalobos, F. Parra-Cota, M.C. Orozco-Mosqueda, A.E. Fadiji, S. Hyder, O.O. Babalola and G. Santoyo. 2023. *Trichoderma* species: Our best fungal allies in the biocontrol of plant diseases—A review. Plants, 12:432. https://doi.org/10.3390/plants12030432

Hammerschmidt, R., E.M. Nuckles and J. Kuc. 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. Physiological Plant Pathology, 20:73-82. https://doi.org/10.1016/0048-4059(82)90025-X

Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology, 96:190-194. https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190

Hawkins, N.J., C. Bass, A. Dixon and P. Neve. 2019. The evolutionary origins of pesticide resistance. Biological Reviews, 94:135-155. https://doi.org/10.1111/brv.12440

Jantarach, J. and D. Thanaboripat. 2010. The efficacy of ethyl acetate extract of *Trichoderma* culture broth on growth inhibition and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* IMI 242684. KMITL Science and Technology Journal, 10(1):19-29.

of *Pseudomonas* including *Pseudomonas savastanoi*. PLOS One, 18(8):e0289875. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289875

Zucchini, M., A. Maoloni, M. Lodolinie, I. Ferrocino, L. Aquilanti and D. Neri. 2023. Knot formation and spread along the shoot stem in 13 olive cultivars inoculated with an indigenous pathobiome of 7 species

Received: July 21, 2024; Accepted: October 22, 2024

تاريخ الاستلام: 2024/7/21؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2024/10/22