

**تسجيل أول لمرض العفن الأبيض المتسبب عن الفطر *Sclerotinia sclerotiorum* على نباتات الزينة الراننكيل *Ranunculus asiaticus* في العراق وفعالية الفطر *Trichoderma viride* والبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* في تثبيطه مختبرياً.**

حسين محمود جاسم الحلبوسي\*

وديجة محسن خضير

باحث

أستاذ /كلية الزراعة /جامعة بغداد

**الخلاصة**

أظهرت نتائج العزل من نباتات الراننكيل المزروعة في أحد البيوت البلاستيكية العائدة إلى قسم البستنة - كلية الزراعة - جامعة بغداد التي ظهرت عليها أعراض اصفرار وذبول الأوراق وتعفن رخو أسفل السيقان الزهرية وموت النباتات المصابة رافق تلك الأعراض وجود أجسام حجرية صغيرة سوداء اللون بقطر 1 - 6 ملم بأن مسبب المرض هو الفطر *Sclerotinia sclerotiorum*. اثبتت اختبارات المقدرة الإراضية لعزلة الفطر *S. sclerotiorum* على نباتات الراننكيل بعمر 30 يوم تحت ظروف البيت البلاستيكي إصابة نباتات الراننكيل بنسبة وشدة إصابة بلغت 100% و 87.5% على التتابع. تم الحصول على عزلة من الفطر *Trichoderma viride* نتيجة العزل من الأجسام الحجرية للفطريات وشخصت هذه العزلة بناءً على الصفات المزرعية والمظهرية وبالتشخيص الجزيئي للفطر باستعمال تقانة PCR. حققت عزلة الفطر *T. viride* نشاطاً تضادياً ضد الفطر *S. sclerotiorum* على الوسط الزرعي PDA تحت ظروف المختبر فقد كانت درجة التضاد 2 وحققت عزلة البكتريا *Pseudomonas aeruginosa* على الوسط الزرعي PDA تحت ظروف المختبر نسبة تثبيط 83.62%. وبينت نتائج اختبار تأثير كل من الفطر *T. viride* والبكتريا *P. aeruginosa* في نشوء الأجسام الثمرية من الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* في المختبر عند ظروف إضاءة مستمرة ودرجة حرارة 15 م° خفضاً معنوياً في عدد الأجسام الثمرية المتكونة إذ بلغت 0.20 و 0.83 / جسم حجري قياساً إلى معاملة المقارنة 1.58 جسم ثمرى / جسم حجري.

**Recording the first white mold disease *Sclerotinia sclerotiorum* on ornamental plants Alrannkil *Ranunculus asiaticus* in Iraq and effectiveness of the fungus *Trichoderma viride* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in inhibition in vitro.**

Hussain M. Jasim AL-Halbusy

Wadeja M. Kuthai

**Abstract**

\* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول

Showed isolation results from plants Alrannkil planted in one of the greenhouses belonging to the Department of Horticulture - Faculty of Agriculture, University of Baghdad, which showed symptoms of yellowing and wilting leaves and rot loose down the stems of flowering and death of infected plants was accompanied by those symptoms, there are objects of stone small black color diameter 1 - 6 mm that the pathogen is a fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Pathogenicity tests have proven the ability to isolate the fungus *S. sclerotiorum* plants Alrannkil age of 30 days under the conditions of the plastic house plants Alrannkil by injury and severity of the injury was 100% and 87.5% on the relay. It was obtained isolation of the fungus *Trichoderma viride* as a result of insulation from stone-fungal objects and personalize this isolation based on Cultural and Morphological traits and molecular diagnosis of technology using PCR. Achieved isolation *T. viride* hottest against fungus *S. sclerotiorum* on culture media PDA under laboratory conditions has been the degree of antagonism 2 and the isolation of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* achieved over the center Zorai PDA ratio under laboratory conditions inhibition of 83.62%. The test showed the effect of each of the fungus Results *T. viride* and *P. aeruginosa* bacteria in the emergence of fruiting bodies of the stone objects of the fungus *S. sclerotiorum* in the laboratory when continuous lighting and a temperature of 15 ° C reduction was significant for the number of fruiting bodies formed conditions, amounting to 0.20 and 0.83 fruit body / stone body in relation to the treatment of comparative 1:58 body My fruit body / stone body.

### المقدمة

نبات الرانكيل *Ranunculus asiaticus* من الأبصال الحولية الشتوية ومن ذوات الفلقتين المعروف محليا بالشقائق أو بالثومة، ينتمي إلى العائلة الشقائقية Ranunculaceae وتعد منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط موطنه الأصلي، كما ينمو هذا النبات برياً في شمال وشرق العراق، أوراقه كفية مفصصة أو مقسمة، وأزهاره تكون قطمر (في الغالب) متعددة الألوان منها: الأحمر، الوردي، البرتقالي، الأصفر والأبيض، أما جذور النبات الدرنية فهي أسطوانية الشكل تحوي عدة فصوص (claws) يمكن فصلها مع جزء من التاج وزراعتها (2). يرجع سبب الاهتمام بزراعة هذا النبات إلى صلاحية أزهاره للقطف تبقى بحدود (10-12) يوماً في المزهرية بدون إضافة مواد حافظة، في الآونة الأخيرة ازداد الاهتمام بهذا النبات كونه يحتوي على بعض المواد التي تستخدم في علاج العديد من الأمراض، حيث تحتوي الجذور الدرنية على مركبات شبه قلوية مفيدة في علاج الروماتزم والحمى وأمراض العيون والتهاب الغشاء المخاطي ومهدئة للأعصاب، كما أن مسحوق بذوره يستخدم كتوابل في صناعة المخللات (38). إن إنتاج أزهار القطف في الحقول المكشوفة تعد الأعلى قيمة مقارنة بالمحاصيل البستانية الأخرى إذ إنها لا تحتاج إلى رأس مال كبير للبدء بإنتاجها (30). يتعرض هذا النبات للاصابة بالعديد من مسببات المرضية منها الفطر الممرض *S. sclerotiorum* المسبب لمرض العفن

الأبيض White mold مسبباً خسائر اقتصادية إذ سجل المرض في كل من الولايات المتحدة (16) واليابان (42) وإيطاليا (17) والأرجنتين (45).

يتميز الفطر بصعوبة مكافحته بسبب إصابته لمدى عائلي واسع مع بقاء تراكيبه الساكنة لمدة طويلة والمتمثلة بالأجسام الحجرية Sclerotia (19) و (20) تعد المبيدات الكيميائية ذات فعالية عالية فإنها تعد من أهم طرق المكافحة لهذا المرض (28). إلا أن استعمالها يرتبط بعدة مشاكل متعلقة بالثمن الباهظ لبعضها وكذلك مشاكل بيئية وصحية بسبب متبقيات السامة (35) و (46). وكذلك تأثيرها في أحياء غير مستهدفة كالأعداء الطبيعية (18) و (40). وبذلك تنمى الوعي بمسألة الحفاظ على البيئة والصحة العامة وإيجاد بدائل عنها (8). وبرزت المكافحة الأحيائية في العقدين الأخيرين طريقة واعدة في مكافحة الفطر الممرض على النباتات بفعل نشاط كائنات حية موجودة طبيعياً أو يدخلها الإنسان إلى التربة (41).

### المواد وطرائق العمل

تم عزل عدد من الأجسام الحجرية من نباتات رائكيل مصابة وضعت في علب بلاستيكية معقمة لغرض استعمالها في الحصول على مزارع الفطر كلما دعت الحاجة ، استعمل عدد من الأجسام الحجرية إذ عقت سطحياً بمحلول هايبو كلورات الصوديوم تركيز 1 % لمدة 2-3 دقيقة و غسلت بالماء المقطر المعقم ونشفت على ورق ترشيع و زرعت في أطباق بتري قطر 9 سم تحتوي على الوسط الزراعي PDA ( Potato Dextrose Agar) المعقم بالمؤصدة عند درجة حرارة 121 م° و ضغط 15 كغم/سم<sup>2</sup> لمدة 20 دقيقة، حضنت الأطباق بدرجة 25 ± 2 م° لحين تكوين الأجسام الحجرية، شخص الفطر من قبل د. هادي مهدي عبود/ رئيس باحثين دائرة البحوث الزراعية/ وزارة العلوم والتكنولوجيا.

غسلت الأجسام الحجرية بالماء المقطر المعقم لإزالة بقايا التربة وجففت في ورق نشاف معقمة ووضعت 4 جسم حجري/طبق بتري حاوية على الوسط PDA المضاف له المضاد الحيوي Tetracycline وحضنت الأطباق بدرجة 25 ± 2 م° لحين ظهور الفطريات المرافقة للجسم الحجري. وبعد ظهور مستعمرة الفطر *Trichoderma* حول الجسم الحجري تم تنقيتها وإكثارها على الوسط PDA المعقم في أطباق معقمة شخص الفطر اعتماداً على الصفات المظهرية والمجهريّة من قبل د. حمديّة زاير / وزارة العلوم والتكنولوجيا. تم تنفيذ هذه الدراسة في مختبر شعبة المكافحة الأحيائية لمسببات الأمراض النباتية / مركز المكافحة المتكاملة / دائرة البحوث الزراعية / وزارة العلوم والتكنولوجيا.

تم استخلاص الحامض النووي DNA من الفطر *Trichoderma sp* باعتماد طريقة (23) وقدر تركيزه ونقاوته حسب طريقة (24). تم ترحيل DNA على هلام الاكاروز بتركيز 1% واستعمل DNA Ladder معروفة الأوزان الجزيئية والتي تكون بين 120 bp إلى 1200 bp واستعمل البادئان Forward-5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3' و ITS1- TCTGTAGGTGAACCTGCGG3' -5

ITS4-Reverse (44) و (26) وبروتوكول جهاز PCR Cyclyer (23) وبعد اكتمال عملية التضخيم Amplification الريبوسومل الدنا (rDNA) باستعمال زوج البادئ جرى ترحيل الدنا على جل الاكاروز 1% لمعرفة عدد أزواج القواعد النيتروجينية له قياسا بالـ Ladder القياسي

### جدول 1 بروتوكول جهاز PCR Thermal . Cyclyer

المواد	درجة الحرارة	الزمن/دقيقة	عدد الدورات
Initial Denaturation	94 °C	2	1
Denaturation	94 °C	1	35-25
Annealing	53 °C	1	
Extension	72 °C	1	
Final Extension	72 °C	2	1

استعمل في هذه التجربة خليط من تربة مزيجة وبتموس نسبة 1:1 بعد تعقيمه بالمؤصدة لمدة ساعة مرتين يفصل بين كل مرة وأخرى مدة يومين وزعت التربة في أصص بلاستيكية قطر 18سم وبمقدار 2 كغم لكل أصيص. زرع جذرين من الجذور الدرنية لنبات الرانكيل المعقمة سطحيا بمحلول هايپوكلورات الصوديوم تركيز 1% لمدة ثلاث دقائق في كل أصيص على عمق 5 سم مع رص التربة فوق الجذور بشكل جيد لغرض منع تكوين فجوات هوائية و منع تعفن الجذور الدرنية مع إجراء الري كلما دعت الحاجة مع مراعاة عدم تعرض تربة الأصيص للجفاف (4) و بعد ان بلغ عمر النباتات 30 يوما لقحت بالفطر المعزول *S. sclerotiorum* (17) بوضع أقراص من مستعمرة الفطر النامي على الوسط PDA بعمر 5 أيام أخذت بواسطة ثاقب فلين قطره 5 ملم قرصين / نبات وضع عند قاعدة الساق على سطح التربة (45) و بثلاث مكررات و تركت ثلاثة أصص بدون تلقيح بالفطر للمقارنة، غلفت الأصيص بأكياس من البولي أثلين لمدة ثلاثة أيام مع متابعة الأصص لحين ظهور الأعراض إذ أخذت القراءات بعد أسبوعين من إجراء عملية التلقيح وسجلت النسبة المئوية للإصابة و شدة الإصابة باتباع الدليل المرضي المؤلف من 5 درجات كما يأتي 0 = لا توجد إصابة 1 = نسبة الإصابة 1-25 % بشكل اصفرار الأوراق 2 = نسبة الإصابة 26-50 % بشكل اصفرار و ذبول 3 = نسبة الإصابة 51-75 % بشكل اصفرار و ذبول وجفاف 4 = نسبة الإصابة 76 - 100 % بشكل ذبول و موت أجزاء النبات .

تم اختبار المقدرة التضادية للفطر *T.viride* ضد الفطر الممرض *S. sclerotiorum* باتباع طريقة الزرع المزدوج باستعمال أطباق بتري قطر 9 سم تحتوي على الوسط الزرعي PDA قسم كل طبق إلى قسمين متساويين، لفتح مركز القسم الأول من كل طبق بقرص قطر 5ملم من مستعمرة الفطر الممرض المنمى على الوسط الزرعي PDA بعمر ثلاثة أيام ولفتح مركز القسم الآخر من الطبق بقرص بقطر 5 ملم من مزارع الفطر *T. viride* بواقع أربعة مكررات ولقحت أربعة أطباق بالفطر الممرض فقط للمقارنة. حضنت الأطباق عند درجة حرارة 25± م لمدة 4 أيام بعدها تم تقدير التضاد وفقا لسلم التقييس المعد من قبل (10) المكون من خمس درجات.

اختبرت المقدرة التضادية للبكتريا *P.aeruginosa* ضد الفطر الممرض *S.sclerotiorum* حسب ما ذكره (13) بعمل 4 خطوط من اللقاح البكتيري المنمى على الوسط Nutrient broth بعمر 48 ساعة باستعمال إبرة التلقيح ذات العقدة يبعد كل منها 2 سم من حواف الطبق ولقح مركز الطبق بقرص من النمو الفطري على الوسط الزرعي PDA بعمر 4 أيام قطره 0.5 سم وبثلاث أطباق وثلاث أطباق لمعاملة المقارنة من دون اللقاح البكتيري، وضعت الأطباق في الحاضنة عند درجة حرارة  $25 \pm 1$  م° لمدة 4 أيام وحسب مقدار التنشيط باتباع المعادلة أدناه.

$$\% \text{ للتنشيط} = \frac{\text{معدل قطر النمو الفطري في معاملة المقارنة} - \text{معدل قطر النمو الفطري في معاملة البكتريا}}{100 \times}$$

معدل قطر النمو الفطري في معاملة المقارنة

نفذت هذه التجربة في مختبر المبيدات الأحيائية / دائرة وقاية المزروعات / وزارة الزراعة.

استعملت شرائح جزر معقمة سطحيا بمحلول هايپوكلورات الصوديوم تركيز 1 % كلور حر لمدة 5 دقائق لإكثار الفطر *S. sclerotiorum*، بعد ذلك غسلت جيدا بالماء المقطر المعقم عدة مرات ونشفت من الماء الزائد و وضعت في أطباق زجاجية معقمة قطر 19 سم، لقحت الشرائح بأقراص من الوسط لزرعي PDA المنمى عليه الفطر *S. sclerotiorum* بعمر 4 أيام قطر 5 ملم باستعمال ثاقب الفلين المعقم جرى التلقيح تحت ظروف معقمة في جهاز الامينر ( Laminar air flow ) وضعت بعدها الأطباق في الحاضنة عند درجة حرارة  $25 \pm 2$  م° لحين تكوين الأجسام الحجرية مع إجراء تفريغ الأطباق من السوائل التي تتجمع فيها كلما دعت الحاجة.

استعمل في هذا الاختبار 48 جسم حجري من الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* المتكونة على شرائح الجزر عقت سطحيا بمحلول هايپوكلورات الصوديوم وزرعت في أطباق زجاجية معقمة حاوية على تربة مزيجة معقمة أضيف لها 10 مل من عالق الفطر *T. viride* تركيز  $1.25 \times 10^7$  بوغ / مل (3)، وضع في كل طبق 8 أجسام حجرية وثلاث مكررات للمعاملة وثلاث أطباق للمقارنة من دون الفطر *T. viride* أضيف لها 10 ماء مقطر معقم / طبق وضعت الأطباق في الحاضنة عند درجة حرارة 15 م° و إضاءة مستمرة (6) أضيف اللقاح البكتيري بمقدار 10 مل / طبق تركيز  $2 \times 10^6$  مع مراعاة إضافة الماء المقطر المعقم إلى الأطباق في كلا الاختبارين لضمان توفير غشاء مائي كلما دعت الحاجة (5) وبعد مرور 14 أسبوعا تم حساب المعايير الأتية عدد السويقات المتكونة من الأجسام الحجرية و طول السويقات المتكونة من الأجسام الحجرية باستعمال الفيرنية (Verniercaliper) و عدد الأجسام الثمرية Apothecia المتكومة على الحوامل و قطر الأجسام الثمرية باستعمال الفيرنية.

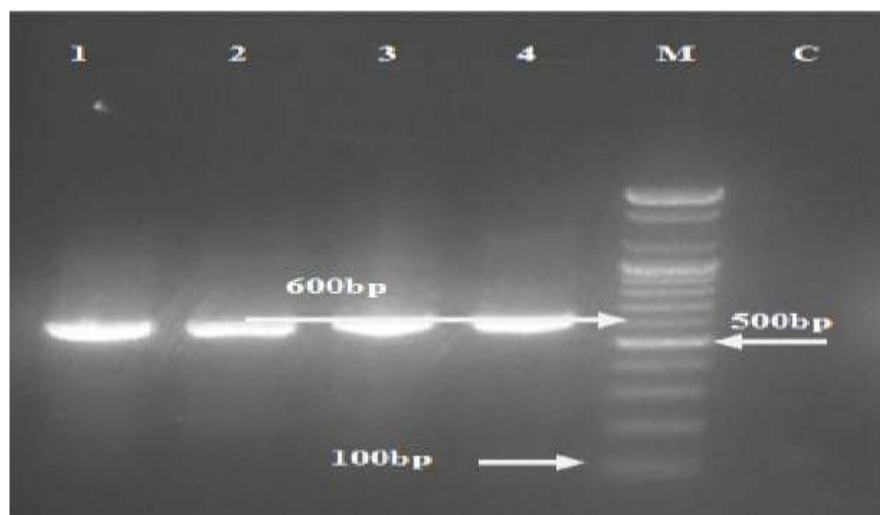
## النتائج والمناقشة

### عزل الفطر الممرض *Sclerotinia sclerotiorum* من نباتات الرانكيل *Ranunculus asiaticus* المصابة

أظهرت نتائج العزل ان الفطر *S. sclerotiorum* هو المسبب وجاءت هذه مطابقة لما ذكره كل من (17) في إيطاليا و (21) في كوريا و (45) في الأرجنتين في تسجيل أول لمرض العفن الأبيض بشكل لطخ بنية مائية على السيقان الزهرية لنباتات الرانكيل قرب سطح التربة وتلون الأوراق بلون اصفر ويتقدم الإصابة تتحول إلى اللون بني وظهور أعراض ذبول وموت النباتات المصابة بعد أيام قليلة من بدء الإصابة ثم تغطية المناطق المصابة بغزل فطري ابيض تلاها تكون أجسام حجرية في تلك المناطق بان المسبب هو الفطر *S. Sclerotiorum* إذ طبقت فرضيات كوخ بإعادة العزل والتأكد من علاقة المسبب بتلك الأعراض.

### التشخيص الجزيئي للفطر *Trichoderma viride*

أظهرت نتائج تقدير تركيز DNA باستعمال جهاز NanoDrop German (Nanospec cube) ان تركيز DNA كان 600 ng /  $\mu$ l وان نسبة الامتصاصية للقيمة  $A_{260/230}$  كانت  $\geq 2.0$  وهذا يعني ان العينة خالية من التلوث بالكربوهيدرات بينما القيمة  $A_{260/280}$  كانت بين 1.4-1.7 والذي يعني ان العينة خالية من التلوث بالبروتين كما هو مبين في صورة (1). كما بينت نتائج التشخيص الجزيئي للفطر *Trichoderma* sp بان حجم PCR Product كان 600 bp وهذه النتائج مطابقة مع ما وجدته (12). وتشير هذه النتيجة إلى أن منطقة ITS للمؤشر rDNA والذي صمم بواسطة (44)، ممكن ان تطبق بفعالية لتشخيص الكائنات الممرضة. وعلاوة على ذلك، فإنه يمكن إعطاء معلومات هامة للتحقق في ظاهرة تعدد الأشكال بين الأجناس الفطرية.



شكل 1 صورة الترحيل الكهربائي لعملية تضخيم PCR Amplification باستعمال البادئات ITS4 و ITS1 للفطر *Trichoderma viride*. الخط 1-4 تضخيم ITS-PCR للفطر *Trichoderma viride*. الخط M = DNA. Control = C Ladder 100bp (AL-Musayyib bridge Company).

## المقدرة الامراضية الفطر الممرض *S. sclerotiorum* على نباتات الراننكيل في ظروف البيت البلاستيكي

أظهرت النتائج ان عزلة الفطر *S. sclerotiorum* حققت نسبة إصابة بلغت 100 % إذ أصيبت جميع نباتات الراننكيل في الأصيص بظهور لطخ بنية مائية على أجزاء النباتات قرب سطح التربة بعد أسبوعين من التلقيح ثم تغطيت المناطق المصابة بغزل فطري ابيض تلاها تكون أجسام حجرية في تلك المناطق (صورة 2) وبلغت شدة الإصابة 87.5%.

تعود إصابة الفطر لجميع النباتات وارتفاع شدة المرض فيها ربما لامتلاكه اليات متعددة تمكنه من اختراق انسجه العائل بتسليط ضغط ميكانيكي على النسيج الذي يلامسه عن طريق تكوين أعضاء التصاق وإفراز العديد من الأنزيمات عند تفاعله مع العائل التي تحلل الجدران الخلوية وربما لإنتاجه تراكيز عالية من حامض الاوكزاليك مما يؤدي إلى سحب أيونات الكالسيوم  $Ca^{+2}$  من جدران الخلايا مما يجعل المواد البكتينية أكثر قابلية للتحلل وكذلك للكنين (11) و (27). قد أشار DeBary في (1865) إلى ان موت خلايا العائل يتقدم غزو هايفات الفطر لتلك الخلايا وان سبب تحول المناطق المصابة إلى نسيج رخو عصيري يعود لإنتاج الفطر إلى أنزيمات ومواد سامة تؤدي إلى تحلل وقتل تلك الخلايا (7). ان ظهور الأعراض بعد أسبوعين من التلقيح يتفق مع ما وجدته (17) و (45) من ان ظهور أعراض الإصابة بالفطر *S. sclerotiorum* وموت النباتات الملقحة به يحدث بعد أسبوع إلى ثلاثة أسابيع من التلقيح وظهور نمو فطري ابيض في مناطق الإصابة.



شكل 2 صورة اختبار إمراضية الفطر *S. sclerotiorum* على شتلات نبات الراننكيل في ظروف البيت البلاستيكي. أ - نبات سليم غير ملقح بالفطر *S. sclerotiorum* (معاملة السيطرة) ب - نبات ملقح بالفطر *S. sclerotiorum* تظهر عليه أعراض المرض وعلامات المسبب المرضي.

## القدرة التضادية للفطر *Trichoderma viride* ضد الفطر الممرض *S. sclerotiorum* مختبرياً في الوسط الزراعي PDA

أظهرت النتائج وجود مقدرة تضادية لعامل مكافحة الأحيائية *T.viride* ضد الفطر الممرض *S. sclerotiorum* في ظروف المختبر بعد 4 أيام من التحضين بدرجة حرارة  $25 \pm 2$  م° إذ بلغت درجة التضاد حسب السلم الذي وضعه (10) (شكل 3).



وعند ترك أطباق معاملة التضاد المزدوج لمدة أسبوعين استمرت فعالية الفطر *T. viride* في كبح تقدم الفطر الممرض و حدوث ظاهرة النمو فوق المسبب المرضي (Overgrowth) كما يلاحظ في الصورة (3) و جاءت هذه النتيجة مطابقة لما أشار اليهم (14) و (1) مما يدل على انه من النوع Biotrophic ربما تعود قدرة الفطر *T. viride* في تثبيط الفطر *S. sclerotiorum* إلى ربما قدرة أنواع الفطر *Trichoderma spp* على التطفل من خلال تكوين تراكيب حلزونية و الالتفاف حول غزل الفطر الممرض و اختراق هايفاته و ربما لإنتاج الأنزيمات المحللة لجدران خلاياه ومنها أنزيمي Chitinases و gulcanases (29) و (34) أو لإنتاجه مواد أيض ثانوية مضادة مثل glioviridin و viridian و gliotoxin (37) و مواد أيض ثانوية طيارة تعمل على تثبيط الفطريات الممرضة (36).



شكل 3 صورة تأثير الفطر *T. viride* في نمو الفطر *S. sclerotiorum* بطريقة الزرع المزدوج.  
 أ - ظاهرة التضاد بين الفطر *T. viride* والفطر الممرض *S. sclerotiorum* بعد 4 ايام من التحضين  
 ب - المقارنة الفطر الممرض بمفرده  
 ج - نتيجة التضاد بعد اسبوعين وظاهرة Overgrowth (النمو فوق المسبب المرضي)

القدرة التضادية للبكتريا *P. aeruginosa* ضد الفطر الممرض *S. sclerotiorum* مختبرياً في الوسط  
 الزراعي PDA

أوضحت نتائج الاختبار ان للبكتريا *P. aeruginosa* مقدرة تضادية عالية ضد الفطر *S. sclerotiorum* (الشكل 4) إذ بلغت نسبة التثبيط 78% قياساً إلى معاملة المقارنة من دون اللقاح البكتيري 0%. وهذه النتيجة تتسجم مع ما توصل اليه، (15) إذ تراوحت النسب المئوية لتثبيط الفطر *S. sclerotiorum* باستعمال عزلات من البكتريا *P. aeruginosa* 62 . 83%، وما توصل اليه (13) في الزراعة المزدوجة للفطر الممرض *Sclerotium rolfsii* باستعمال ثلاث عزلات من البكتريا *P. aeruginosa* على الوسط PDA إذ بلغت النسب المئوية للتثبيط 51.25 . 60%. ويعزى قدرة البكتريا على تثبيط نمو الفطر الممرض ربما لإنتاجها مواد أيض ثانوية ومركبات عضوية وأنزيمات ومضادات حيوية وسيانيد الهيدروجين وغيرها فضلاً عن منافسة الفطر الممرض على المكان والمواد الغذائية (22)، أو لإنتاجها المواد الطيارة السامة والأنزيمات المحللة لجدران خلايا الفطر الممرض مثل Pectinases و Proteases (9).



شكل 4 صورة تضاد الفطر *S. sclerotiorum* و البكتريا

*P. aeruginosa* بعد 4 أيام من إجراء التلقيح بطريقة

الخطوط الأربعة



تأثير الفطر *T. viride* والبكتريا *P. aeruginosa* في إنتاج الأجسام الثمرية من الأجسام الحجرية للفطر  
الممرض *S. sclerotiorum*

أظهرت النتائج جدول (2) وصورة (5) ان كل من الفطر *T. viride* والبكتريا *P. aeruginosa* أحدثا خفضا معنوياً في عدد السويقات النامية من الأجسام الحجرية وعدد الأجسام الثمرية المتكونة عليها فقد بلغ 0.29 و 0.20 و 1.29 و 0.83 / جسم حجري على التتابع قياساً لمعاملة المقارنة 2.08 و 1.58 / جسم حجري على التتابع وبلغ طول السويقات ( ملم ) وقطر الجسم الثمري ( ملم ) في معاملي الفطر *T. viride* والبكتريا *P. aeruginosa* 0.67 و 0.59 ملم ، 0.76 و 0.73 ملم على التتابع اذ لا يوجد فرق معنوي بينهما قياساً لمعاملة السيطرة 5.13 ملم و 3.49 ملم بالتتابع ، تعود كفاءة الفطر *T. viride* وتفوقه معنوياً على البكتريا *P. aeruginosa* في خفض عدد السويقات والأجسام الثمرية بعد 13-14 أسبوعاً من الحضانة تحت ظروف درجة حرارة 15 م° وأضاءه مستمرة إلى انه قد عزل من الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* .

و هذا ما أشار إليه (33) و (7) وآليات الفطر *Trichoderma* المتعددة فقد ذكر (31) تعود قدرة الفطر *Trichoderma spp* على تحطيم الجسم الحجري للفطر *S. sclerotiorum* وربما إلى إنتاجه المواد الأيضية المضادة مثل glioviridin و Viridin و glotoxin (37) وقدرته على التطفل وقد لوحظ ذلك في تجربة التضاد تحت ظروف المختبر من نمو الفطر فوق المسبب المرضي Overgrowth ويشاهد ذلك في الشكل (3) وإيقاف نمو المرض Fungistasis (32) أو ربما لإنتاجه المواد الطيارة مثل الأثلين وسيانيد هايدروجين (43) و (36) وتعود فعالية البكتريا في خفض عدد السويقات والأجسام الثمرية وطول السويقات وقطر الجسم الثمري ربما إلى قابلية البكتريا *P. aeruginosa* لإنتاج إنزيمات gluconases , cellulytic ، Chitinolytic (37)، أو لإنتاج الأنزيمات المحللة لجدران الخلايا Pectinases و proteases (9) وتعود انخفاض كفاءة البكتريا قياساً إلى الفطر *Trichoderma* إلى ان ظروف التجربة عند درجة حرارة 15 م° ربما غير ملائمة لهذه البكتريا فقد ذكر (15) يعتمد إنتاج البكتريا *P. aeruginosa* للمواد المضادة على الظروف البيئية وظروف التغذية.

جدول 2 تأثير الفطر *T. viride* و البكتريا *P. aeruginosa* في إنتاج الأجسام الثمرية من الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*.

المعاملات	الصفات المدروسة	عدد السويقات (ملم)	طول السويقات (ملم)	عدد الأجسام الثمرية / جسم حجري	قطر الجسم الثمري (ملم)
Control		2.08	5.13	1.58	3.49
<i>P. aeruginosa</i>		1.29	0.76	0.83	0.73
<i>T. viride</i>		0.29	0.67	0.20	0.59
D .S .L		0.31	4.12	0.43	2.43



ج



ب



أ

شكل 5 صورة تأثير الفطر *T. viride* والبكتريا *P. aeruginosa* في إنتاج الأجسام الثمرية من الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*.  
 أ - تأثير الفطر *T. viride* في الأجسام الثمرية للفطر الممرض *S. sclerotiorum* ومن ثم جفاف الجسم الثمري بالكامل نتيجة تطفل الفطر *T. viride* وتحوله إلى اللون الأخضر نتيجة تكوين السبورات مؤدي إلى جفافها ومن ثم موتها.  
 ب - تأثير البكتريا *P. aeruginosa* على نشوء الأجسام الثمرية من الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*  
 ج - شكل الأجسام الثمرية الناتجة من الجسم الحجري للفطر الممرض *S. sclerotiorum* في معاملة المقارنة.

#### المصادر

- 1- الجراح، نيران سالم احمد، 2011. تأثير الخليط الحيوي EM1 والمجال المغناطيسي في حماية نباتات الخيار من الإصابة بمسببات التعفن وسقوط البادرات. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة-جامعة بغداد. 138 ص.
- 2- الخطيب، أحمد شفيق، 1988. معجم الشهابي في مصطلحات العلوم الزراعية، مكتبة لبنان، بيروت.
- 3- الدليمي، فراس طارق رشيد، 2013. تحديد سلالات الفطر *fusarium oxysporum* sp. Cicer ومكافحته باستخدام عوامل استحثاث أحيائية وفيزيائية. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد.
- 4- التلاوي، كريمة عبد عيدان، 2007. تأثير البورون والماء الممغنط في نمو وأزهار نباتي الداليا *Dahlia variabilis* والراننكيل *Ranunculus asiaticus*. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد.

- 5- حناوي، محمد جبير، 1986. دراسة ومقاومة حيائية للفطر *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) DeBary على محصول الباذنجان في البيوت البلاستيكية. رسالة ماجستير. قسم الوقاية. كلية الزراعة. جامعة بغداد.
- 6- نعمة، رباب علي وسمير صالح حسن، 2013. بعض الصفات المظهرية لمفطر *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Debary. مجلة العلوم الزراعية العراقية. 44: 629-635.
- 7- Agrios, G. N., 2005. Plant Pathology. 5th edition. Elsevier Academic press, New York. USA. 922 pp.
- 8- Arslan, U., K. Ilhan, C. Vardar and O.A. Karabulut, 2009. Evaluation of antifungal activity of food additives against soilborne phytopathogenic fungi. World J. Microbiol. Biotechnol. 25: 537-543.
- 9- Babu, G.P., D.Chakravarthy, K. Jaya Kumar. and Ch.Paramageetham, 2013. Plant Growth Promoting and Disease Suppressing *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated From Seshachalam Hills of Eastern Ghats. ASIAN J. EXP. BIOL. SCI.VOL 4: 306-309.
- 10- Bell, D. K., H. D. Well and G. R. Markham, 1982. Invitro antagonism of *Trichoderma Spp.* against six fungi, Plant pathogens. Phytopathology. 72: 379-382.
- 11- Caliskan, M, 2000. The metabolism of oxalic acid, Turk. J Zool., 24: 103 – 106.
- 12- Chakraborty, B.N., U. Chakraborty., A. Saha and P.L. Dey and K. Sunar, 2010. Molecular Characterization of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* isolated from Soils of north bengal based on rDNA markers and analysis of their PCR-RAPD profiles. global journal of Biotechnology and Biochemistry. 5 : 55-61.
- 13- Chanutsa, N , Nutchanat Phonkerd, Wandee Bunyatratchata, 2014 . Potential of *Pseudomonas Aeruginosa* to Control *Sclerotium Rolfsii* causing stem rot and collar rot disease of tomato. Journal of Advanced Agricultural Technologies. 2:132-135.
- 14- Cornea, C. P., A. Pob, S. Matei, M. ciuca, C. voaides, M. A. Matei, G. Poba, A. Voicu and M. Stefanwscu, 2009. Antifungal action of new *Trichoderma* spp. Romanian isolates on offerent plant pathogen. Biotchnol & Biotechnological Equipment 23:766 – 770.
- 15- Deshwal, Vishal Kumar, 2012. *Pseudomonas aeruginosa* as biological control agent against plant pathogenic fungus *sclerotinia sclerotiorum*. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences. 2: 2231- 4490.
- 16- Farr, D.F; G.F. Bills, G.P. Chamuris; A.Y. Rossman, 1989. Fungi on Plants and Plant Products in the United States. St. Paul: APS Press. 1252p.
- 17- Garibaldi, A., A. Minuto. and M. L. Gullino, 2003. First resport of Whilt mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on Persian buttercup ( *Ranunculus asiaticus* ) in Italy. Plant Dis.87: 151.1 - 151.1
- 18- Gilmour,G, 2001. Canola growers losing Benlate Fungicide. MB cooperator. 58:1.

- 19- Grogan, R. G, 1979. *Sclerotinia* species: summary and comments on needed research Phytopathology 69: 908–910.
- 20- Gulya, T., K. Y. Rashid and S. M. Masirevic. 1997. Sunflower Diseases. In A.A.Schneider, ed. Sunflower Technology and Production. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Society of America. pp.834.
- 21- Han, K. S., and M. J.Park, 2013.First Report of *Sclerotinia* Stem Rot of *Ranunculus asiaticus* Caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Korea. Plant Diseases. 99 . 1653 PP.
- 22- Hillel , D, 2005. Plant Growth promoting Bacteria. Elsevier, Oxford, U. k.,103-115.
- 23- Hamdia, Z. Ali and Kalaivani Nadarajah, 2014c. Evaluating the Efficacy of *Trichoderma* Isolates and *Bacillus subtilis* as Biological Control Agents against *Magnaporthe oryzae* in Rice. Publication Journal: Australian Journal of Crop Science: 8(9):1324-1335.
- 24- Kalaivani, Nadarajah and Z. A. Hamdia, 2014. The Isolation and Characterization of an endochitinase gene from a malaysian isolate of *Trichoderma* . Australian Journal of Crop Science: 8:711-721.
- 25- White, T.J., T. Bruns., S. Lee., J.W. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. Academic Press, Inc., NewYork, pp. 315-322.
- 26- Nadarajah, K., H. K. Krishnan and Hamdia Z. A, 2014. Cellular and Molecular Interactions of *Magnaporthe oryzae* S3 in Rice. Journal of Pure and Applied Microbiology. 8: 3481-3491.
- 27- Kora, C. ; M. R. McDonald, and G. J. Boland, 2003. *Sclerotinia* rot of carrot an example of phonological adaptation and bicyclic development by *Sclerotinia sclerotiorum*, Plant Disease, 87: 456 – 470.
- 28- Kurozawa, C.; M. A. Pavan ; D. Kimati, H., L. Amorim; F. A. Bergamin; L.E.A. Camargo ; J. A. M. Rezende, 1997. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres. p.690-719.
- 29- Matroudi, M. and MR., S. Zamani, 2009. Antagonistic effects of three species of *Trichoderma sp.* on *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot, Egyptian Journal of Biology, 11: 37 – 44.
- 30- Mengmeng, Gu, 2009. Specialty Cut Flower Production Resources: References. Mississippi State University Extension Service.
- 31- Monaco, C. I.; M. C. Rollan and A. I. Nico, 1998. The effect of mycoparasites on the reproductive ability of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Revista-Iberoamericana-de-Micologia*. 15: 2, 81-84.
- 32- Mont, E, 2001. Understanding Tricoderma: between biotechnology and microbial ecology. Int. Microbial.4:1-4.

- 33- Ousley, M.A., J.M. Lynch, J.M. Whipps, 1994. The effects of addition of *Trichoderma* inocula on flowering and shoot growth of bedding plants. *Scientia Horticulturae*. 59 : 147-155
- 34- Rehman, S., R. Lawrence, E. J. Kumar and Z. Badri, 2012. Comparative efficacy of *Trichoderma viride*, *T. harzianum* and carbendazim against damping-off disease of cauliflower caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn J. Bio pest. 5 : 23-27.
- 35- Rocha, J. R. S and N. T. Oliveira, 1998. Controle biológico de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose do mraçujazeiro (*Passiflora edulis*), com *Trichoderma koningii*. *Summa Phytopathologica*, 24: 180-183.
- 36- Seema, M. and N.S. Devaki, 2012. In vitro evaluation of biocontrol agents against *Rhizoctonia solani*. *International Journal of Agricultural Technology*. 8: 233-240.
- 37- Shabir, S. and L. Rubina, 2010. Biological control of damping-off disease of cabbage caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Applied Biological Research*. 12: 38-41.
- 38- Shukla, P and Misra, S. P, 1985. An introduction to taxonomy of Angiosperms. Pp. 450-453.
- 39- Sindhu, S.S. and K.R. Dadarwal, 2001. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* spp. Antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* spp. Cicer in chickpea. *Microbiol Rev*, 56:662-676.
- 40- Strange, R. N. and P. R. Scott, 2005. Plant disease: a threat to global food security *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 83–116.
- 41- Tu, J. C, 1997. An integrated control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of beans , with emphasis on recent advances in biological control, *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 38: 73 – 76.
- 42- Urushibara, T. et al. *Annu. Rep. Kanto-Tosan Plant Prot. Serv.* 46:61, 1999.
- 43- Vey, A., R.E. Hoagland and T.M. Butt, 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: TM Butt, C Jackson, N Magan eds *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. CAB International, Bristol, pp. 311-346.
- 44- White, T.J., T. Bruns., S. Lee., J.W. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. Academic Press, Inc., NewYork, pp. 315-322.
- 45- Wright, E. R., M. C. Rivera , and G. Chiesa, 2005. Occurrence of *Sclerotinia* Stem Rot of *Osteospermum* sp., *Felicia amelloides*, and *Ranunculus asiaticus* in Argentina. 89:1014 PP.
- 46- Zadoks, J. C, 1993. Antipodes on crop protection in sustainable agriculture. *Pest Control and Sustainable Agriculture*. S. Corey, D. Dall, and W. Milne, eds. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia. p. 3-12.