جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة كربلاء

كلية التربية للعلوم الصرفة – قسم علوم الحياة

تأثير فطر *Trichoderma harzianum* و بعض الفطريات المرافقة للفطر *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary و العوامل البيئية في الأجسام الحجرية للفطر و أنتاج حامض الأوكزاليك

رسالة تقدم بها

ميثم ناصر نعمة الجبوري

الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة كربلاء

و هي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / النبات – الفطريات

بإشراف

الأستاذ الدكتورة بان طه محمد

1434 هـ 2013 م

بسم الله الرحمن الرحيم

وأن الفضل بيد الله يؤتيه من يشاء

والله ذو الفضل العظيم

صدق الله العلي العظيم

سورة الحديد المباركة : الآية الكريمة ٢٩

إقرار المشرف

أشهد بأن إعداد هذه الرسالة قد جرى بإشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / النبات .

التوقيع .

الاسم : أ. م. د. بان طه محمد

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2013

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة الى التوصية في أعلاه من قبل الأستاذ المشرف ، أحيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها و بيان الرأي فيها .

التوقيع .

الاسم : أ. حسين علي عبد اللطيف

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2013

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة أدناه نشهد بإطلاعنا على الرسالة الموسومة " تأثير فطر *Trichoderma harzianum* و بعض الفطريات المرافقة للفطر *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary و العوامل البيئية في الأجسام الحجرية للفطر و إنتاج حامض الأوكزاليك" وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وكل ما يتعلق بها و وجدنا إنها جديرة بالقبول بتقدير (امتياز) لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / نبات (الفطريات) .

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. علاء عيدان حسن

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : جامعة الكوفة / كلية الزراعة

التاريخ : /١٠/٢٠١٣

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. ابتهال معز عبد المهدي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة بابل / كلية العلوم

التاريخ : /١٠/٢٠١٣

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. رجاء غازي عبد المحسن

المرتبة العلمية : مدرس

العنوان : جامعة كربلاء / كلية الزراعة

التاريخ : /١٠/٢٠١٣

عضو اللجنة و المشرف

التوقيع :

الاسم :د. بان طه محمد

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : /١٠/٢٠١٣

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

أُصادق على ما جاء في قرار اللجنة اعلاه

التوقيع :

الاسم : د.نجم عبد الحسين نجم

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : عميد كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ : /١٠/٢٠١٣

إقرار المقوم اللغوي

أشهد بأن الرسالة الموسومة (تأثير بعض الفطريات على الصفات الفسلجية و الجزيئية للأجسام الحجرية المنتجة بالمختبر للفطر *Sclerotinia* sclerotiorum (Lib.) De Bary و علاقتها بحيويته) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية و تصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية و تعبيرية و بذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب و صحة التعبير .

التوقيع :

الاسم : د. سلام موجد خلخال

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

الكلية و الجامعة : جامعة كربلاء – كلية التربية للعلوم الانسانية

التاريخ : / / 2013

الإهداء

في سبيل الله تبارك و تعالى

الى نبينا العظيم محمد صلى الله عليه و اله و سلم

الى الأئمة الأطهار صلوات الله و سلامه عليهم اجمعين

الى أبي . . . . . أنت في القلب

الى أمي . . . . . أنتِ الغالية

الى عائلتي . . . . . جزيل الشكر

اهدي ثمرة جهدي المتواضع هذا

مسلم

شكر و تقدير

الحمد لله الواحد الأحد الفرد الصمد الأول قبل وجود كل شيء و الباقي بعد فناء كل شيء و الصلاة و السلام على اعظم خلق الله الرسول الأكرم و النبي الأعظم خاتم الأنبياء و المرسلين سيدنا و حبيبنا ابي القاسم محمد صلوات الله و سلامه عليه و اله الطيبين الطاهرين الميامين الاكرمين اجمعين .

اتقدم بفائق الشكر و التقدير الى استاذتي الفاضلة الأستاذ الدكتورة بان طه محمد التي تفضلت بالإشراف على اعداد هذه الرسالة و لجهودها المستمرة و توجيهاتها القيمة عبر مدة البحث .

و يسرني كذلك ان اتقدم بالشكر الجزيل الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة و رئاسة قسم علوم الحياة لما ابدياه من مساندة كان لها الأثر الكبير في اكمال متطلبات البحث .

كما اتقدم بالشكر و الامتنان الى الاستاذ الدكتور عبدعون الغانمي و الأستاذ الدكتورة حميدة عيدان سلمان و الدكتورة رحاب الجبوري و الدكتور نصير مرزة حمزة و السيد سمير هويدي .

و اتقدم بالشكر و التقدير الى الزميل و الاخ الاستاذ خالد علي حسين و الست بان موسى و الزملاء حيدر عبد المنعم و زينة ثامر و سناء خادم و بسمة عزيز و شهلة محمد علي و مصطفى عباس و جعفر سلمان و دعاء فايق و سرى فاضل و اخيرا اتقدم بالشكر الى كل من قدم لي يد العون و المساعدة لإتمام هذه الدراسة و الله الموفق و هو الهادي الى سواء السبيل .

مبتسم

الخلاصة

أجريت عدد من التجارب المختبرية في مختبر الدراسات العليا لقسم علوم الحياة – كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء لدراسة تأثير بعض الفطريات المعزولة من الأجسام الحجرية للفطر *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary فضلا على الفطر *Trichoderma harzianum* في النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum* ، و تم دراسة تأثير نوع الوسط الغذائي و الرقم الهيدروجيني في النمو القطري و أنتاج حامض الأوكزاليك الذي يعد العامل الأساس في أمراضية الفطر .

أتضح من نتائج تنمية الأجسام الحجرية أن هنالك نمطين لتوزيعها هما نمط التوزيع المنتظم و نمط التوزيع غير المنتظم . و تم أختبار ثلاثة فطريات كانت مرافقة للأجسام الحجرية تمثلت بالفطر *Aspergillus niger* و الفطر*Aspergillus terreus* و الفطر *Penicillium sp.* ، إذ شكلت الأنواع العائدة للفطر *Aspergillus* نسبة ظهور عالية متفوقة على الفطر *Penicillium sp.* . استخدمت الرواشح الخام للفطريات المعزولة من الأجسام الحجرية و راشح الفطر *T. harzianum* بتراكيز 15% ، 30% ، 45% و 60% لدراسة تأثيرها في نمو الفطر *S. sclerotiorum* في الوسط الغذائي PDA الحاوي على هذه الرواشح ، فوجد ان راشح الفطر *T. harzianum* ثبط نمو الفطر بنسبة 100% عند التركيزين 45% و 60% ، و كذلك راشح الفطر *Penicillium sp.* الذي سجل نسبة تثبيط 100% عند التركيز 60% ، أما راشح الفطر *A. terreus* فقد سجل نسبة تثبيط 60% عند التركيزين 45% و 60% ، في حين كان راشح الفطر *A. niger* اقل تثبيطاً إذ سجل نسبة 58.8% عند التركيز 60% .

أظهرت تقنية صفائح كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) احتواء جميع مستخلصات الفطريات على مركبات مختلفة و متشابهة في قيم التحرك النسبي R_f ، و اختلفت هذه المستخلصات في عدد البقع على صفائح (TLC) ، إذ سجل الفطر *T. harzianum* 23 بقعة و الفطر *A. terreus* 21 بقعة و الفطر *A. niger* 20 بقعة و الفطر *Penicillium sp.* 16 بقعة . و بينت النتائج بأستعمال كواشف كيميائية متعددة أن المستخلصات الفطرية حاوية على العديد من المركبات الفعالة ، فقد احتوت جميع المستخلصات على القلويدات و التانينات و الكاربوهيدرات و اشتركت جميعها في عدم احتوائها على الفينولات ، فقد احتوى مستخلص الفطر *A. niger* على الفلافونيدات في حين لم يحتوِعلى الصابونينات و الكلايكوسيدات ، اما مستخلص الفطر *A. terreus* فقد احتوى على الصابونينات و الكلايكوسيدات و الفلافونيدات ،

في حين لم يحتوِ مستخلص الفطر *Penicillium sp.* على الفلافونيدات الا انه سجل وجود الصابونينات و الكلايكوسيدات ، و احتوى مستخلص الفطر *T. harzianum* على الكلايكوسيدات و لم يحتوِ على الصابونينات و الفلافونيدات .

و فيما يخص تأثير المستخلصات في نمو الفطر *S. sclerotiorum* سجل مستخلص الفطر *A. terreus* معدل تثبيط 1.375 ملم ثم الفطر *Penicillium sp.* بمعدل لم يختلف كثيرا عن معاملة السيطرة هو 37° .0 ملم اما مستخلص الفطر *A. niger* و مستخلص الفطر *T. harzianum* فلم يسجل أي تثبيط . تضمنت الدراسة ايضا بيان الآلية التضادية للفطريات المعزولة من الأجسام الحجرية و الفطر *T. harzianum* بوصفها واحدة من الآليات المهمة في المكافحة الإحيائية ضد الفطر *S. sclerotiorum* ، إذ اظهر الفطر *A. terreus* كفاءة تضادية عالية في حين انخفضت الكفاءة التضادية تدريجيا للفطريات الأخرى .

أما تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر *S. sclerotiorum* و انتاج حامض الأوكزاليك ، فقد بينت النتائج ان نمو الفطر *S. sclerotiorum* في الوسط الغذائي CDA و الوسط الغذائي PDA قد سجل اعلى القيم إذ غطى الفطر مساحة الطبق بالكامل عند اليوم السابع من الحضن بنسبة 100% ، في حين انخفضت مستويات النمو في الاوساط OA و SDA ، و سجل الفطر اعلى نسبة مئوية له في انتاج حامض الأوكزاليك عند نموه في وسط SDA ثم انخفضت النسبة عند الأوساط الأخرى . اما بالنسبة لتاثير الرقم الهيدروجيني فقد اعطى الرقم الهيدروجيني 6 اعلى نسبة نمو عند اليوم السابع في حين سجل الرقم الهيدروجيني 7 اعلى معدل لتأثير الأرقام الهيدروجينية في نمو الفطر على وسط PDA ، و بينت النتائج ان الرقم الهيدروجيني 7 قد سجل اعلى نسبة مئوية لأنتاج حامض الأوكزاليك من الفطر ، في حين انخفضت النسبة و بشكل كبير في ال pH 5 ، 5.5 ، 6 ، 6.5 و 7.5 .

المحتويات

الرقم	الموضوع	الصفحة
	الخلاصة	I
	المحتويات	III
	قائمة الجداول	VIII
	قائمة الأشكال	IX
	الفصل الأول : المقدمة	١
	الفصل الثاني : استعراض المراجع	
1-2	لمحة تاريخية	4
2-2	الخصائص التشخيصية للفطر *S. sclerotiorum*	4
١-٢-2	الخصائص المظهرية و المجهرية للفطر *S. sclerotiorum*	4
2-2-2	الخصائص التصنيفية للفطر *S. sclerotiorum*	5
3-2	الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*	٥
4-2	دورة حياة الفطر *S. sclerotiorum*	٧

5-2	أهمية حامض الأوكزاليك في امراضية الفطر *S. sclerotiorum*	٨
٦-٢	المكافحة الاحيائية للفطر *S. sclerotiorum*	٩
1-6-2	اليات المكافحة الأحيائية للفطر *S. sclerotiorum*	١١
7-2	استخدام بعض الفطريات في المكافحة الإحيائية	١٣
1-7-2	استخدام الفطر *A. niger* van Tieghem في المكافحة الإحيائية	١٣
2-7-2	استخدام الفطر *A. terreus* Thom في المكافحة الإحيائية	١٤
3-7-2	استخدام الفطر *Penicillium sp.* في المكافحة الإحيائية	١٤
4-7-2	استخدام الفطر *T. harzianum* Rifai في المكافحة الإحيائية	١٥
8-2	دور العناصر الغذائية و الرقم الهيدروجيني pH في امراضية الفطر *S. sclerotiorum*	١٧
	الفصل الثالث : المواد و طرائق العمل	
٢-3	الأوساط الزرعية المستخدمة	٢٠
1-٢-3	وسط اكار البطاطا و الدكستروز Potato Dextrose Agar	٢٠
٢-٢-3	وسط الزابك Czapek Dox Agar	٢٠
٣-٢-3	وسط الشوفان Oat Agar	٢١
٤-٢-3	وسط سابرويد دكستروز اكار Sabrouaud Dextrose Agar	٢١
٥-٢-3	وسط مستخلص البطاطا و الدكستروز السائل Potato Dextrose Broth	٢١

٣-3	المحاليل و الصبغات المستخدمة	٢٢
١-٣-3	صبغة اللاكتوفينول ازرق المثيلين	٢٢
٢-٣-٣	محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH	٢٢
٣-٣-3	محلول حامض الهيدروكلوريك HCL (5) عياري	٢٢
٤-٣-3	محلول برمنغنات البوتاسيوم KMnO4 (0.02) عياري	٢٢
٤-3	طرائق العمل	٢٣
١-٤-3	عزل الفطر الممرض *S. sclerotiorum*	٢٣
2-٤-3	تنمية الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*	٢٣
3-٤-3	عزل و تشخيص بغض الفطريات المرافقة للأجسام الحجرية	٢٣
٥-٤-3	الفطر *T. harzianum*	٢٤
٥-3	تأثير الرواشح الخام للفطريات المعزولة من الأجسام الحجرية و راشح الفطر *T. harzianum* على النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum*	٢٤
1-٥-3	تحضير الرواشح الخام للفطريات	٢٤
2-٥-3	اختبار تأثير الرواشح الخام للفطريات على النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum*	٢٥
٦-3	دراسة بعض الخصائص الكيميائية و الفيزيائية للرواشح الفطرية المعزولة من الأجسام الحجرية و الفطر *T. harzianum*	٢٥
١-٦-3	قياس مقدار التحرك النسبي R_f	٢٦
٢-6-3	الكشف عن بعض المجاميع الفعالة للمستخلصات الفطرية	٢٧

٣-٧	تأثير الرواشح الفطرية في نمو الفطر *S. sclerotiorum*	٢٩
٣-٨	أختبار الكفاءة التضادية للفطريات المعزولة من الأجسام الحجرية و الفطر *T. harzianum* ضد الفطر *S. sclerotiorum*	٣٠
٣-٩	تأثير بعض العوامل البيئية في النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum* و انتاج حامض الأوكزاليك	٣١
٣-٩-1	الوسط الغذائي	٣١
٣-٩-2	الرقم الهيدروجيني	٣١
٣-٩-٣	تقدير النسبة المئوية لحامض الأوكزاليك Oxalic Acid	٣٢
٣-١٠	التحليلات الإحصائية	٣٢
	الفصل الرابع : النتائج و المناقشة	
4-1	بعض الصفات المظهرية للأجسام الحجرية الناتجة على وسط PDA	٣٣
4-2	الفطريات المرافقة للأجسام الحجرية	٣٥
4-3	تأثير الرواشح الخام للفطريات المعزولة من الأجسام الحجرية و راشح الفطر *T. harzianum* على النمو القطري للفطر *S.sclerotiorum*	٣٦
4-4	مقدار التحرك النسبي R_f للمكونات المفصولة بتقانة صفائح كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography	٤١
4-٥	المجاميع الفعالة للمستخلصات الفطرية	٤٦
4-٦	تأثير المستخلصات في نمو الفطر *S.sclerotiorum*	٤٩
4-٧	إختبار الكفاءة التضادية للفطريات المعزولة من الأجسام الحجرية و الفطر *T. harzianum* ضد الفطر *S.sclerotiorum*	٥١

4-٨	تأثير بعض العوامل البيئية في معدل النمو القطري للفطر *S.sclerotiorum* و أنتاج حامض الأوكزاليك	٥٤
4-٨-1	تأثير نوع الوسط الغذائي في النمو القطري للفطر	٥٤
4-٨-2	تأثير نوع الوسط الغذائي في النسبة المئوية لإنتاج حامض الأوكزاليك	٥٧
4-٨-3	تأثير الرقم الهيدروجيني pH في النمو القطري	٥٩
4-٨-4	تأثير الرقم الهيدروجيني pH في النسبة المئوية لأنتاج حامض الأوكزاليك	٦١
	الاستنتاجات و التوصيات	
	الأستنتاجات	٦٣
	التوصيات	٦٤
	المصادر	
	المصادر العربية	٦٥
	المصادر الأجنبية	٦٦
	Summary	A

قائمة الجداول

الرقم	الموضوع	الصفحة
1	المواد الكيميائية المستخدمة	١٨
2	الاجهزة المستخدمة	١٩
3	الفطريات المرافقة للأجسام الحجرية و نسبة ظهورها خلال مدد حضن مختلفة	٣٦
٤	تأثير نوع و تركيز رواشح بعض الفطريات في النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum* (سم) بعد سبعة أيام من الحضانة	٣٩
٥	عدد البقع و قيم التحرك النسبي R_f للمستخلصات الفطرية	٤٣
6	نتائج الكشوفات النوعية للمستخلصات الفطرية	٤٨
7	تأثير المستخلصات الفطرية الخام في تثبيط نمو الفطر *S. sclerotiorum* (ملم) النامي على وسط PDA بعد سبعة ايام من النمو	٥١
8	الكفاءة التضادية للفطريات المعزولة من الأجسام الحجرية و الفطر *T. harzianum* ضد الفطر *S. sclerotiorum* في الوسط الغذائي PDA	٥٣
9	تأثير نوع الوسط الغذائي و مدة الحضن في معدل النمو القطري لفطر *S. sclerotiorum* (سم) بدرجة حرارة 20 ± 2 °م	٥٦
10	تأثير نوع الوسط الغذائي في النسبة المئوية لإنتاج حامض الأوكزاليك Oxalic Acid من الفطر *S. sclerotiorum*	٥٨
11	تأثير الرقم الهيدروجيني و مدة الحضن في معدل النمو القطري لفطر*S. sclerotiorum* (سم) وبدرجة حرارة 20 ± 2 °م	٦٠
12	تأثير الرقم الهيدروجيني pH في النسبة المئوية لإنتاج حامض الأوكزاليك Oxalic Acid من الفطر *S. sclerotiorum*	٦٢

قائمة الأشكال

الرقم	الموضوع	الصفحة
1	نمط التوزيع المنتظم للأجسام الحجرية لفطر *S. sclerotiorum* على وسط PDA بدرجة حرارة 20 ± 2 °م بعد 15 يوم من الحضانة	٣٤
٢	نمط التوزيع غير المنتظم للأجسام الحجرية لفطر *S. sclerotiorum* على وسط PDA بدرجة حرارة 20 ± 2 °م بعد 15 يوم من الحضانة	٣٤
3	تأثير تراكيز الرواشح الفطرية في النسبة المئوية لتثبيط الفطر *S. sclerotiorum*	٤٠
4	الفطريات النامية على وسط PDB بدرجة حرارة 25 ± 2 °م و لمدة 14 يوم	٤٠
٥	عينة راشح الفطر *A. niger* المفصولة باستخدام تقنية TLC	٤٤
٦	عينة راشح الفطر *A. terreus* المفصولة باستخدام تقنية TLC	٤٤
٧	عينة راشح الفطر *Penicillium sp.* المفصولة باستخدام تقنية TLC	٤٥
٨	عينة راشح الفطر *T. harzianum* المفصولة باستخدام تقنية TLC	٤٥
٩	تأثيرنوع الوسط الغذائي و مدة الحضن في النسبة المئوية لنمو الفطر *S. sclerotiorum* بعد ٥ و ٧ ايام من الحضن	٥٧
١٠	تأثير الرقم الهيدروجيني pH في النسبة المئوية لنمو الفطر *S. sclerotiorum* بعد ٥ و ٧ ايام من الحضن	٦١

الفصل الأول

المقدمة

Chapter One

Introduction

الفصل الأول

المقدمة

يعد الفطر *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary من فطريات التربة الممرضة للنبات الذي يصيب اكثر من 400 نوع نباتي في كل مراحل النمو و في اثناء حصاد المحاصيل الزراعية ، إذ ان الامراض التي يسببها معروفة عموما مثل التعفن الابيض white Mould و عفن الساق Stalk Rot و الذبول السكليروتيني Sclerotinia Wilt (Suleman و آخرون ، 2008) و يوصف الفطر *S. sclerotiorum* بأنه يسبب الامراض لمدى واسع من النباتات في جميع ارجاء العالم مثل زهرة دوار الشمس و فول الصويا و الكانولا و الحمص و الفستق و البازلاء و العدس و ايضا العديد من نباتات الخضار(Bolton و آخرون ، 2006) .

أن الفطر *S.sclerotiorum* من الفطريات صعبة المكافحة بسبب انتاجه للأجسام الحجرية Sclerotia المقاومة للظروف غير الملائمة (محمد، 2001) . ان الاجسام الحجرية تكون مقاومة للجفاف و الحرارة و المبيدات الفطرية و يمكن ان تبقى حية و فعالة في التربة لسنوات عديدة (Melo و آخرون، 2011) . يؤدي بقاء الفطر *S.sclerotiorum* على قيد الحياة بين المحاصيل على شكل اجسام حجرية الى انباته اما خضريا Myceliogenically لكي يصيب الغزل الفطري النبات بشكل مباشر او يكون الانبات جنسيا Carpogenically و ذلك لإنتاج الجسم الثمري الخاص بالفطر *S. sclerotiorum* من نوع Apothecia الذي يقوم بتحرير الابواغ الكيسية Ascospores التي بعد ذلك تصيب النبات المضيف (Jones و Stewart ، 2000) .

يعد محتوى التربة الحيوي احد اكثر العوامل اهمية في تحديد بقاء الجسم الحجري حياً، إذ ان بعض الاحياء المجهرية المعروفة هي مضادات او طفيليات فطرية لأنواع الجنس *Sclerotinia* ، فالتغاير الموجود في طول مدة بقاء الفطر على قيد الحياة في الاقل يعود جزئيا الى تنوع مجتمع الاحياء الدقيقة المتواجدة في التربة (Saharan و Mehta ، 2008) .

تستعمل بعض الفطريات و البكتريا و احياء التربة الأخرى الجسم الحجري كمصدر للكاربون بالتطفل عليه ، و تنشط مثل تلك الأحياء خلال الدورة الزراعية و بهذا يعد لها دور في تقليل كفاءة الأجسام الحجرية ، و يوجد عدد من الفطريات المشخصة على أنها تتطفل على الأجسام الحجرية Mycoparasitic Fungi او Antagonistic Fungi التي تشمل انواع تعود للفطر *Trichoderma* و الفطر *Gliocladium* و ايضا فطريات متطفلة اخرى تعود للأجناس : *Acrostalagmus* , *Fusarium* , *Hormodendrum* , *Mucor* ,

Penicillium , *Aspergillus* , *Stachybotrys* , *Verticillium* ، حيث وصفت هذه الاجناس الفطرية كطفيليات على الاجسام الحجرية . تم استخدام الفطر *Coniothyrium minitans* في أختزال عدد و حيوية الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* في التربة (Dhliwayo ، 2008) .

وجد ان فطر *S. sclerotiorum* يقوم بإنتاج حامض الاوكزاليك Oxalic Acid ، إذ ابدى حامض الاوكزاليك تاصراً مع الانزيمات الأخرى البكتينية و المحللة للسليولوز و ذلك لتحطيم انسجة المضيف ، و هو اساسي في تحديد الامراضية ، كما ان تراكم حامض الاوكزاليك يوفر بيئة منخفضة الحامضية pH إذ يعد من افضل الظروف المنشطة للأنزيمات الاخرى (Fernando و آخرون ، 2004) .

ان الدراسات المتعلقة بالمتطلبات الغذائية للممرضات تعد من المؤشرات المهمة لمعرفة العلاقة بين الممرض و العائل ، اذ يعد الكاربون و النتروجين من العناصر الغذائية الرئيسة و الاساسية في العمليات الوظيفية و التركيبية عند الفطريات (Safavi و اخرون ،٢٠٠٧) ، إذ وجد ان الفطر *S. sclerotiorum* يستخدم بشكل متساوٍ السكروز و الدكستروز من اجل النمو في حين يستخدم الكلوكوز و اللاكتوز كمصادر للكاربون لبناء الاجسام الحجرية و ايضا للنمو (Marciano و اخرون ،١٩٨٩; Maxwell،١٩٧٣; Vega و اخرون ،١٩٧٠) . و لقد لوحظ ان تراكم الاوكزالات و هي املاح حامض الاوكزاليك الذي يعد عامل امراضية مهم جدا قد ازداد مع وجود الكلوكوز و بعض مصادر الكاربون الاضافية مثل Malate و Acetate (Robbins ، ١٩٣٧)، و لقد عدّ النتروجين ثاني اهم عنصر مهم للفطريات ويستخدم الفطر نترات البوتاسيوم و نترات الصوديوم و نترات الكالسيوم و ايضا املاح الامونيوم للنمو و تحفيز تكوين الاجسام الحجرية (Willets و Wong، ١٩٨٠)، فضلا على اهمية العناصر الغذائية وجد ان الرقم الهيدروجيني pH يعمل على تنظيم تراكم الاوكزالات ، اذ تزداد عملية تصنيع الاوكزالات بزيادة pH الوسط و يساهم في استمرار النمو و يسيطر على عملية صناعة الاجسام الحجرية ضمن مدى معين حيث ان الفطريات تختلف بالنسبة للنوع او بالنسبة للأفراد في داخل النوع في تحملها للرقم الهيدروجيني الذي يؤثر على تكوين الاجزاء التكاثرية ، و بينت بعض الدراسات ان الرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي يستمر بالتغير بأتجاه الحامضية بسبب النشاط الايضي للفطر*S. sclerotiorum* و الذي يتضمن انتاج بعض الاحماض مثل Malic Acid (Culbertson و آخرون ، 2007 ; Agnihotri و Rai ، 1971) .

و بالنظر لأهمية الفطر *S. sclerotiorum* الاقتصادية الناتجة عن اصابته لمدى واسع من المحاصيل الزراعية و مقاومته للظروف غير الملائمة ولإنتاجه الأجسام الحجرية ، لذا هدفت الدراسة الى :

1. عزل بعض الفطريات المرافقة للأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* و تقييم الكفاءة التثبيطية لها .

2. استخدام فطر المكافحة الاحيائية *T. harzianum* و الفطريات المعزولة من الأجسام الحجرية *A. niger* ، *A. terreus* و *Penicillium sp.* في تثبيط الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* .

3. الكشف عن أهم المركبات الفعالة في الفطريات المضادة للفطر *S. sclerotiorum* .

4. دراسة تأثير نوع الوسط الغذائي و الرقم الهيدروجيني في نمو الفطر *S. sclerotiorum* .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Chapter Two

Literature Review

الفصل الثاني

استعراض المراجع

2-1. لمحة تاريخية

وصف الفطر *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary لأول مرة من Libert عام1837 تحت اسم *Peziza sclerotiorum* ، و في عام 1870 قام Fuckel بوضع الفطر تحت جنس جديد هو *Sclerotinia* و تغير اسم النوع الى *libertiana* ، و في عام ١٨٨٤ جاء De Bary ليعدل اسم الفطر الى *Sclerotinia sclerotiorum* كما قام ايضا في عام 1886 بدراسة مطولة عن امراضية الفطر إذ اكد De Bary ان الفطر *S. sclerotiorum* يحرر في اثناء اصابة النباتات حامض الاوكزاليك (Bashi ، 2011) ، ثم جاء Whetzel في عام 1945 ليغير العائلة Sclerotiniaceae و اورد اسماً جديدا للفطر و هو *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary لكي يتلاءم مع الفطريات التي تحرر ابواغ كيسية بيضوية الشكل ، و على امتداد تطور عائلة Sclerotiniaceae فقد تم ادراج 12 نوع تابع للجنس *Sclerotinia* بما فيها الفطر *S. minor* و الذي وصف من قبل Jagger عام 1920، و في عام 1972 غير Korf و Dumont تسمية الجنس من *Sclerotinia* الى *Whetzelinia* مع بقاء اسم النوع من دون تغير ليصبح الاسم العلمي للفطر *Whetzelinia sclerotiorum* ، و اخيرا و بعد الكثير من المناقشات التي جرت بين العلماء و المختصين تم رفض اسم الجنس *Whetzelinia* و قبول اسم الجنس الحالي *Sclerotinia* ليصبح الاسم العلمي للفطر *Sclerotinia sclerotiorum* (Hoyte ، ٢٠١٢ ; Smith ، 2004) .

2 – 2. الخصائص التشخيصية للفطر *S. sclerotiorum*

2 – 2 – 1. الخصائص المظهرية و المجهرية للفطر *S. sclerotiorum*

ينتج الفطر *S. sclerotiorum* النامي في الوسط الغذائي Potato Dextrose Agar (PDA) بدرجة حرارة 20 – 25 مْ غزلا فطريا شفاف او عديم اللون Hyaline متفرع على نحو مستمر قطني المظهر و في بعض الحالات يظهر الغزل الفطري اما باللون البني الغامق في المنطقة المحيطة بقرص اللقاح في مركز الطبق او يكون لون المستعمرة بنياً فاتحاً بشكل كامل ، اما الخيط الفطري فيكون مقسماً بحواجز Septate قريبة بعضها من بعض في داخل الخلية ، و

يتراوح عرض الخيط الفطري بين ٢ – 9.4 مايكرو متر و يمتلك حبيبات بروتوبلازمية كثيفة ، و فيما يخص الاجسام الحجرية Sclerotia تظهر في وسط PDA بشكل مماثل للأجسام الحجرية الموجودة في المضيف النباتي من حيث الخصائص المظهرية أي تكون دائرية او غير منتظمة الشكل سوداء اللون مقعرة من جهة و محدبة من الجهة الثانية و يتراوح عددها بين 22- 45 جسم حجري لكل طبق من اطباق بتري الحاوية على وسط(PDA ، و بعد ذلك تبدأ الاجسام الحجرية بالإنبات لتعطي تراكيب عمودية تدعى Stipes إذ بدورها تتطور الى تركيب قمعي يشبه الكأس يدعى Apothecium الذي يمثل الجسم الثمري للفطر و هو محمول على قمة التراكيب العمودية ، إذ يمتاز هذا التركيب بأنه بني اللون دائري او كروي الشكل يتراوح طوله بين ٥ – 21 ملي متر و قطر القرص يتراوح بين 2 – 9 ملي متر ، ويتراوح عدد الاجسام الثمرية Apothecium بين 1 – ٩ لكل جسم حجري . تكون الاكياس Asci عديمة اللون اسطوانية الشكل ذات ابعاد تتراوح بين٤,٩ – ٨,٥ X ٩١ – ١٦٥ مايكرو متر ، إذ ان كل كيس يحتوي على 8 ابواغ كيسية Ascospores مرتبة بشكل اهليليجي و يتراوح حجمها بين ٦,٥ – ١٣ X ٤,٢ – ٦,٦ مايكرو متر ، و يكون انطلاق الابواغ الكيسية بشكل سحابة (Cuong و Dohroo ، 2006 ; Barari و أخرون ، 2010) .

2 – 2 – 2. الخصائص التصنيفية للفطر *S. sclerotiorum*

يعود الفطر *S. sclerotiorum* (Lib.) De Bary الى مملكة الفطريات Fungi و شعبة Ascomycota و صنف Discomycetes و رتبة Helotiales و عائلة Sclerotiniaceae و جنس *Sclerotinia* (Bolton و آخرون ، 2006) .

2-3. الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*

تقوم الاجسام الحجرية بالدور الكبير في انتاج لقاح الفطر *S. sclerotiorum* وهي الوسيلة الاولى لبقاء الفطر حيا لمدة تصل الى 8 سنوات في التربة ، و يعرف الجسم الحجري Sclerotium على انه تجمع للخيوط الفطرية محاط بقشرة سوداء خارجية تدعى Rind و هي الطبقة الاولى من الجسم الحجري التي تحتوي على بعض خلايا سميكة منتجة لصبغة الميلانين Melanin ، إذ يعزى لهذه الصبغة عملية حماية العديد من الفطريات و منها الفطر *S. sclerotiorum* من الظروف البيئية غير الملائمة و الهجمات التي تقوم بها الاحياء المجهرية

الاخرى ، و ينتج الفطر *S. sclerotiorum* صبغة الميلانين بشكل مركب Dihydroxynaphthalene (DHN) ، و ايضا تمتاز الطبقة الخارجية او طبقة Rind باحتوائها على طبقات مستمرة ملتوية تصل الى حافات الجسم الحجري ثم تنخفض لتعطيه المظهر المتموج ، اما الطبقة الثانية التي تدعى Medulla او الطبقة الداخلية فتكون بيضاء اللون او شفافة مطمورة في حشوة ليفية مؤلفة من الكاربوهيدرات و البيتاكلوكانز و البروتينات (Bolton و آخرون ، 2006 ; Willetts ، ١٩٦٩; Michael و آخرون ، 2009) .

ذكر Le Tourneau (1979) أنَّ الجسم الحجري يتألف من الدهون و البروتين و الكاربوهيدرات و احماض امينية و احماض دهنية و رماد ، كما اكد على وجود كميات كبيرة من الكاربوهيدرات في الكتلة الجافة من الجسم الحجري الناضج علاوة على الكايتين و الكلايكوجين و التريهالوز و المنيتول و الكلوكوز و الفركتوز اما بقية الكاربوهيدرات فإنّ وجودها يعتمد على مصدر الكاربون في الوسط الغذائي .

يوجد ثلاثة انواع من الاجسام الحجرية الخاصة بالفطر *S. sclerotiorum* و هي النوع الطبيعي الذي يكون فيه الجسم الحجري املس السطح و الطبقة الخارجية Rind سوداء و الطبقة الداخلية Medulla بيضاء ، و النوع الثاني هو غير الطبيعي إذ يكون الجسم الحجري مجعد السطح و الطبقة الخارجية سوداء و الطبقة الداخلية بنية اللون ، و بالمقارنة مع النوع الطبيعي فان النوع غير الطبيعي يكون مشوهاً من الناحية التركيبية بسبب ارتشاح العناصر الغذائية بشكل حاد مما يؤدي الى اختزال مدة بقاء الجسم على قيد الحياة ، إذ ان الانواع غير الطبيعية قد تكونت نتيجة العوامل الفسلجية و ليس نتيجة العوامل الوراثية ، اما النوع الثالث فهو الجسم الحجري البني الذي يتم انتاجه من سلالات نادرة جدا من الفطر *S. sclerotiorum* و تم جمع هذه الاجسام فضلاً على اجسام ثمرية بيضاء اللون من نباتات دوار الشمس و الخس المصابة بالفطر *S. sclerotiorum* (Huang و Yeung ، ٢٠٠٢) .

تعد الطريقة التي تتجمع بها الخيوط الفطرية اساسا لتصنيف تطور الجسم الحجري ، حيث توجد ثلاثة انواع رئيسة من التطور و هي Terminal و Strand و Loose و علاوة على ذلك فان عملية تكوين الجسم الحجري تحدث ايضا في ثلاث مراحل , فالمرحلة الاولى هي الاستهلالية و فيها يتم تجميع المواد الاولية للجسم الحجري و المرحلة الثانية هي التطور و فيها يصل الجسم الحجري الى حجمه الكامل ، اما المرحلة الثالثة فهي النضج و فيها يتم تكوين الكتلة المرصوصة مع خلايا صبغية سوداء خارجية (Le Tourneau 1979) .

وجد Georgiou و آخرون (2003) أنّ حامض الاسكوربيك Ascorbic Acid له دور في تمايز Differentiation الجسم الحجري و خصوصا في صيغة Ascorbat و تحت

ظروف جهد الأكسدة Oxidative Stress ، إذ ان تحول الجسم الحجري من اللاتمايز الى التمايز يكون مصحوبا بتغير حاد في بيئة عمليات الاكسدة و الاختزال الخاصة بالصيغة Ascorbat من اجل تحويلها الى صيغة متاكسدة .

تؤثر مستويات Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) المنخفضة على تحول الفطر *S. sclerotiorum* من الطور الممرض الى الطور المترمم ، كما ان الانخفاض في مستويات (cAMP) ناتجة عن افراز حامض الاوكزاليك Oxalic Acid الذي يساهم ايضا في توفير بيئة حامضية من اجل تطور الجسم الحجري و اكمال دورة حياة الفطر (Hegedus و Rimmer ، 2005) .

اوضح Dickman و Chen (2005) أنّ زيادة مستويات (cAMP) تؤدي الى عرقلة تطور الجسم الحجري للفطر *S. sclerotiorum* ، إذ أنّ (cAMP) يثبط فعالية Mitogen – Activated Protein Kinase (MAPK) الذي يعد ضروريا في عملية نضج الجسم الحجري و من ثمّ تم اقتراح الانزيم Protein Kinase A (PKA) بوصفه عاملاً وسطياً في تثبيط (MAPK) بواسطة (cAMP) .

2 – 4. دورة حياة الفطر *S. sclerotiorum*

توجد اربع مراحل في دورة حياة الفطر و هي الاجسام الحجرية Sclerotia و الجسم الثمري Apothecium و الابواغ الكيسية Ascospores و الغزل الفطري Mycelium (Purdy ، 1979) . تمثل الاجسام الحجرية اهم المراحل و ذلك لبقائها حيوية و فعالة لمدة طويلة و مقاومتها للظروف غير الملائمة (Hansen ، 2009) . لقد عدّ Steadman و آخرون (2011) أنّ عملية تكوين الاجسام الحجرية هي اهم الية لبقاء الفطر حيا . و اوضح Frate و Long ،(2005) وجود دراسات تؤكد بقاء بعض الاجسام الحجرية فعالة و حيوية في القناة الهضمية للأغنام .

يكون انبات الجسم الحجري بالاعتماد على الظروف البيئية على نوعين ، يؤدي النوع الاول الى تكوين جسم ثمري Apothecium و يدعى هذا النوع من الانبات Carpogenic Germenation الذي يتطلب من الجسم الحجري ان يكون في بيئة او تربة رطبة و باردة و محاطة بالظل و ان يوجد على عمق 2 – 5 سم و درجة حرارة بين 4 - 16 مْ و من ثمّ بزوغ واحد او اكثر من الاجسام الثمرية و تستغرق عملية الانبات من 2 – 8 اسابيع ، و بعد اكتمال نمو الاجسام الثمرية تبدا بتحرير الابواغ الكيسية التي قد تصل اعدادها الى 10ملايين بوغ كيسي

خلال ايام قليلة ضمن البيئة المحيطة بالجسم الحجري ، حيث ان اغلب هذه الابواغ سوف يسقط على النباتات المفضلة من قبل الفطر و التي تبعد مسافة 100 متر عن الاجسام الثمرية و البعض منها قد ينتقل لمسافة 3 – 4 كم بواسطة الرياح فالابواغ الكيسية تبقى محتفظة بحيويتها عند ارتفاعها لأكثر من 6000 متر بواسطة الرياح و هذا يعد مؤشراً لإمكانية انتشارها لمسافات بعيدة ، و تبدأ الابواغ الكيسية بالإنبات في الازهار و الاوراق عند وجود الرطوبة العالية و درجة حرارة 12 – 25 مْ و مع استمرار وجود الندى او الضباب او المطر تستمر حركة المايسيليوم من الانسجة او الاجزاء المصابة الى الانسجة او الاجزاء السليمة العائدة للعائل النباتي مثل الساق و الاوراق و غيرها ، وفي وقت لاحق من تقدم المرض يتم تكوين الاجسام الحجرية اما على سطح النبات او في داخل الساق او غيرها من الاجزاء النباتية ، و عند سقوط النبات الميت او اجزاء ميتة من النبات المصاب بالفطر فان الاجسام الحجرية الموجودة في النبات سوف تسقط هي الاخرى في داخل التربة إذ بإمكانها ان تبقى على قيد الحياة لسنوات عديدة (Olsen و آخرون ، 2003 ؛ Peltier و آخرون ، 2012 ؛ Petrofeza و Nasser ، 2012) .

اما النوع الثاني من الانبات للجسم الحجري فهو على شكل غزل فطري و يدعى هذا النوع من الانبات Myceliogenic Germination إذ تمتد خيوط فطرية بيضاء من الجسم الحجري وهي محفزة على الاصابة نتيجة افرازات العائل لتصيب الجذور و الاجزاء الملامسة لسطح التربة و يستمر المايسيليوم بالانتقال الى الساق و غيره من الاجزاء مكونا الاجسام الحجرية (Willetts و Wong ، 1980 ؛ Steadman و آخرون ، 1995 ؛ Abd-Elmagid ، 2012) .

2 – 5. أهمية حامض الأوكزاليك في امراضية الفطر *S. sclerotiorum*

يعد حامض الاوكزاليك Oxalic Acid (OA) (Ethanedioic Acid) الذي ينتج و يفرز من الفطر *S. sclerotiorum* عاملاً اساسياً و محددا للأمراضية لكونه يمتلك العديد من الاليات الفعالة التي تمكن الفطر من اختراق انسجة العائل ، اذ يقوم الفطر في اثناء اصابة الانسجة النباتية بإفراز تراكيز عالية من الحامض ، حيث يعمل على سحب ايون الكالسيوم Ca^{+2} من جدار الخلية مما يؤدي الى جعل الاجزاء البكتينية اكثر قابلية للتحلل بواسطة انزيمات Hydrolases الفطرية ، كما يعمل حامض الاوكزاليك على خفض الرقم الهيدروجيني pH في النسيج المصاب و تحويله الى وسط حامضي لتنشيط الانزيمات المحللة للجدار الخلوي مثل Pectolases و Cellulases و Hemicellulases و Phosphatidases ، و ايضا للحامض

دور في عملية تحلل اللكنين من خلال تحفيز انزيم Mn-Peroxidase ، و يعد انتاج انزيم Oxalate Oxidase (OXO) و Oxalate Decarboxylase و oxalyl-CoAdecarboxylase و كذلك ترسب حامض الاوكزاليك على شكل ملح ذائب او غير ذائب استجابة دفاعية ضد الحامض المفرز من الفطر (Caliskan ، 2000 ؛ Kora و آخرون ، 2003 ؛ Lu ، 2003) .

وجد Stotz و Guimaraes (2004) من خلال اختبار الفرضية التي تشير الى تأثير الاوكزالات المسبب لذبول الاوراق في النباتات المصابة بالفطر *S. sclerotiorum* أنّ الاوكزالات تغير الاوزموزية في داخل الخلايا الحارسة و كذلك تتداخل مع الهرمون النباتي Abscisic Acid (ABA) المحفز لغلق الثغور . بينت بعض الدراسات الى امكانية استخدام حامض الاوكزاليك من قبل مربي النباتات Plant Breeders في انتخاب نباتات مقاومة للفطر *S. sclerotiorum* (Aurelija و آخرون ، 2012) . اوضح Mwangi و آخرون (2012) بان انتاج الاوكزالات لا يتاثر بحالة النمو للفطر في حين ان تجمع الاوكزالات يعتمد على الظروف الغذائية للوسط الزرعي و لا سيما مصدر الكاربون .

2 – 6 . المكافحة الاحيائية للفطر *S. sclerotiorum*

يعد دور عوامل المكافحة الاحيائية حقيقة ثابتة فهي مكملة في بعض الحالات للمكافحة الكيميائية بسبب وجود فطريات التضاد Antagonistic Fungi التي يكون لها الدور الاهم ، فالمكافحة الاحيائية المعتمدة على الفطريات تمتلك قبولا واسعا بسبب سيطرتها على الامراض النباتية ، و تعد الانواع التابعة للجنس *Trichoderma* محط انظار العديد من الباحثين الذين يمتلكون اسهامات في المكافحة الاحيائية من خلال استخدام الفطريات (Pandya و Saraf، 2010) .

يستخدم مصطلح المكافحة الاحيائية Biological Control او المختصر Biocontrol في مجالات مختلفة من علم الاحياء ، اذ يدل في علم امراض النبات على استخدام الاحياء المجهرية و كذلك النواتج الطبيعية على شكل مستخلصات او خمائر من مصادر متنوعة كمضادات لكبح الامراض ، و جميع اشكال المكافحة الاحيائية يمكن ان تكون مركبات بسيطة من مكونات طبيعية مع فعاليات متخصصة باتجاه ممرض معين او مركبات معقدة تمتلك تأثيرات متعددة على العائل و الممرض و على هذا الاساس تم تعريف المكافحة الاحيائية بأنها استخدام الاحياء المتوطنة او التي تم ادخالها باستثناء النبات العائل المقاوم للمرض بغية ايقاف النشاطات و عمليات الاجتياح الخاصة بواحد او اكثر من الممرضات النباتية (Pal و Gardener ،

2006) . يعد وقت تواجد الاجسام الحجرية الافضل عند تطبيق المكافحة الاحيائية ضد الفطر *S. sclerotiorum* وذلك لكون الاجسام الحجرية اكثر عرضة لهجمات الاحياء المجهرية الاخرى ، و قد وجد ان الاجسام الحجرية القريبة من سطح التربة تكون متأثرة بمواسم الجفاف و كذلك تتأثر بالرطوبة ، مما يؤدي الى حدوث تشققات في الطبقة الخارجية Rind و تسرب المواد الغذائية الامر الذي يساهم ايضا في تعرضها للأحياء المجهرية و الاعفان اضافة الى ان فعالية الاحياء الاخرى تزداد عند سطح التربة إذ يوجد العديد من الفطريات التضادية Antagonistic Fungi و الفطريات المتطفلة Mycoparasitic Fungi و البكتريا التي تم عزلها متطفلة ايضا على الاجسام الحجرية ، وتشمل الفطريات المتطفلة على الجسم الحجري و التي اظهرت فعالية تضادية مجموعة من الانواع مثل *Coniothyrium minitans* , *Trichoderma spp.* , *Sporidesmium sclerotivorum* , *Gliocladium spp.* و كذلك فطريات تابعة للأجناس مثل *Agrostalagmus* , *Fusarium* , *Hormodendrum* , *Mucor* , *Penicillium* , *Aspergillus* , *Stachybotrys* , *Verticillium* و اظهر الفطر *Coniothyrium minitans* و الفطر *Gliocladium virens* قابلية عملية من بين كل الفطريات السابقة على المكافحة الاحيائية للفطر *S. sclerotiorum* و لقد وجد عند استخدام الفطر *C. minitans* في التربة بشكل لقاح قوامه مادة صلبة اصابة الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* على مدار السنة و يمكن ان يخفض بشكل كبير عدد وحيوية الاجسام الحجرية في التربة كما ان استخدام معلق من سبورات الفطر *C. minitans* على الاوراق ادى الى اختزال شدة المرض ، حيث تبين مؤخرا ان استخدام تطبيقات المعلق السبوري للفطر *C. minitans* على بقايا المحاصيل المصابة بالفطر *S. sclerotiorum* تعمل على اختزال انتقال المرض و لاسيما عند المزج مع التربة في اثناء المكافحة الاحيائية (Tu ، 1997) .

يعتمد نجاح عوامل المكافحة الاحيائية على الظروف البيئية التي تساعد في انتشار و تثبيت العوامل في مكان الاصابة ، فالتغير في درجة حرارة الهواء و الرطوبة النسبية يؤثر على اداء الفطريات مثل *Alternaria alternata* , *Dreschlera sp.* , *Fusarium graminearum* , *Myrotheccium verrucaria* المعزولة من نبات الفاصولياء و اللفت في ايقاف الفطر *S. sclerotiorum* و على خلاف ذلك فان الفطر *Epicoccum purpurescens* المنتج للمضادات الحيوية لا يتأثر بالتغير في الظروف البيئية عند استخدامه كمعلق سبوري على الاوراق اذ يسيطر بشكل فعال على العفن الابيض في نبات الفاصولياء و ايضا عند رشه أثناء تزهير أشجار الكيوي ، و اضافة الى الفطر *E. purpurescens* فان الفطر *Trichoderma harzianum* يمتلك قابلية التطفل على الفطر *S. sclerotiorum* كما وجد ايضا ان عملية مزج

التربة مع الفطر *Sporidesmium sclerotivorum* المتطفل على الاجسام الحجرية اثبتت فعاليتها لفترة تمتد اكثر من خمس سنوات في السيطرة على تعفن الساق السكليروتيني في نبات فول الصويا Soybean (Fernando و آخرون ، 2004) .

2 – 6 – ١. اليات المكافحة الاحيائية

1. Mycoparasitism : ان الغزل الفطري و ابواغ عدد من فطريات التربة الممرضة للنبات مثل *Helminthosporium* , *Fusarium* , *Pythium* يمكن ان تكون عرضة للهجوم و التطفل في الوسط الزرعي و في التربة من واحد او اكثر من الفطريات التي تكون من حيث المبدأ غير ممرضة للنبات و ان نمو بعض هذه الفطريات و غيرها في التربة يمنع وجود فطريات و بكتريا في بيئتها و ايضا بعض هذه الفطريات تمتلك قابلية تضادية لبعض فطريات التربة الممرضة للنبات بوساطة افرازاتها الانزيمية و السمية التي تسبب تحلل و موت الفطر ، كما ان اضافة المواد المحسنة للتربة سوف يحث في عدة حالات على زيادة اعداد الاحياء المجهرية من نوع Hyperparasites بالتزامن مع اختزال اعداد الفطريات الممرضة للنبات و هبوط في شدة المرض ، و يمكن الحصول على نتائج مشابهة بواسطة التعقيم الجزئي للتربة او معاملتها بالمبيدات الفطرية التي لها تأثير نوعي و جميع هذه المعاملات تؤثر في الممرض عادة عن طريق تشجيعها لنمو و نشاط فطريات مثل *Trichoderma sp.* و عدد من الفطريات الكيسية و غيرها من الاحياء المجهرية التي اما انها تنتج مضادات حيوية سامة للممرض او انها مضادة له بوسيلة اخرى تثبط نموه و نشاطه ، اذ ان عدد من الفطريات الممرضة للنبات مثل *Sclerotinia sp.* , *Pythium* , *Helminthosporium* تكون حساسة لفطريات Hyperparasites (أكريوس، 1985) .

2. Antibiosis : تؤدي المضادات الحيوية دورا مهما في كبح الامراض النباتية بوساطة انواع معينة من البكتريا و الفطريات ، و تعرف على انها تفاعلات تتضمن انتاج مركبات ذات وزن جزيئي منخفض ، او انها مضادات حيوية تنتج بوساطة احياء مجهرية تمتلك تأثير مباشر على احياء مجهرية اخرى ، فمثلا المضاد الحيوي Phenazine (PHZ) المنتج من قبل *Pseudomonas fluorescens* له دور في مكافحة مرض Take All of Wheat الذي يصيب نبات الحنطة و الذي يسببه الفطر *Gaeumannomyces graminis var. tritici.* (Lo ، 1998). ذكر Howall و Stipanovic (1983) أنّ المضاد الحيوي Gliovirin

المعزول من راشح الفطر *Gliocladium verens* يمتلك كفاءة عالية في تثبيط الفطر *Pythium ultimum* .

3. Metabolite Production : العديد من الاحياء المجهرية النشطة في المكافحة الاحيائية تقوم بإنتاج مواد ايضية يمكنها ان تتدخل في نمو و نشاط الاحياء الممرضة مثل انزيمات التحلل Lytic Enzymes و التي تعتبر من بين اكثر المواد الايضية كفاءة في تكسير المركبات البوليميرية Polymeric Compounds و التي تضم Chitin و Protein و Cellulose و Hemicellulose و DNA ، و قد اظهرت الدراسات قابلية بعض المواد الايضية في ايقاف الممرضات النباتية فمثلا تم مكافحة الفطر *Sclerotium rolfsii* بواسطة البكتريا *Serratia marcescens* من خلال انزيم Chitinase (Heydari و Pessarakli ، 2010) .

و اشار Sahab (2012) الى استخدام خلاصة خلات الاثيل الخام Crude Ethyl Acetate Extract و التي تم الحصول عليها من الفطر *Beauvaria bassiana* ضد سلالات مختلفة من البكتريا الموجبة و السالبة لصبغة كرام عند أي تركيز ، كما اظهرت خلاصة *B. bassiana* نشاط مضاد للفطريات في تركيز تراوح بين 1200- 1600 mg / ml ضد *Alternaria tenuis* و *Fusarium avenaceum* و *F. graminearum* بدون اختلافات معنوية و كذلك ضد *Aspergillus paraziticus* و *F. moniliforme* و *F. oxysporum* .

4. Competition : تعبر هذه الالية عن قدرة عامل المكافحة الاحيائية على منافسة المسببات المرضية على الغذاء والمكان، حيث يتمتع الكائن المقاوم بكفاءة عالية في النمو والتكاثر وتكوين أعداد هائلة من الأبواغ قياساً بغيره من الكائنات الأخرى المتنافس معها ويزداد التنافس عندما يكون المصدر الغذائي في التربة محدداً وإن علاقة التنافس بآلية المقاومة الاحيائية تتطلب معرفة نشاط وصفات الفطر الممرض المستوطن في التربة ومعرفة احتياجاته التي تساعده على البقاء، إذاً فالتنافس بين الأحياء يعتمد على وجود المغذيات وبعض العوامل الأخرى المحددة للنمو كالمكان والأوكسجين (Baker و Cook ، 1974 ؛ Baker ، 1968) . بين Lo و آخرون ، (1996) أن الكائن الحي المستعمل في المقاومة الاحيائية لا يمكن عده منافساً جيداً إلاّ إذا كان قادراً على النمو بصورة جيدة في المنطقة المحيطة بالجذر مشيراً إلى أهمية الخواص الفيزيائية والكيميائية للتربة وما لها من تأثير في نمو الكائن المجهري فضلاً على كفاءته التنافسية.

2 –7.استخدام بعض الفطريات في المكافحة الاحيائية

2 –7– 1. استخدام الفطر *Aspergillus niger* van Tieghem في المكافحة الاحيائية

يمتلك الفطر *A. niger* القدرة الكافية لإيقاف الممرضات النباتية و زيادة حاصل النباتات التي يتواجد عليها كما يعمل على تحويل الفوسفات الموجود في جميع انواع التربة الى شكل جاهز للامتصاص من النبات (Reshu وKhan ، 2012) . وقد عدَ Choubey (2012) الفطر *A. niger* احد عوامل المكافحة الاحيائية . يعد انتاج انزيم Chitinase بوساطة الفطر *A. niger* من اهم الوسائل التي مكنت الفطر من تثبيط الفطريات الاخرى ، اذ يعمل الانزيم على تحلل الكايتين الى Oligomer و Monomers و من ثمّ تحطيم الجدار الخلوي للعديد من الفطريات الممرضة للنبات ، كما يشترك انزيم Chitinase و 1,3-β-glucanase مع العديد من المركبات المضادة للفطريات (Brazezinska و Jankiewicz ، 2012) .

تمكن Dhliwayo (2008) من عزل الفطر *A. niger* مع سبعة عشر فطرا اخر من تربة حقل يحتوي على نباتات بطاطا مصابة بالفطر *S. sclerotiorum* إذ و جد باستخدام تقنية الزرع المزدوج Dual Culture Technique ان الفطر *A. niger* هو الاكثر تثبيطا للفطر *S. sclerotiorum* من بين الفطريات المعزولة . اشار Sahile و آخرون (2011) الى عزل الفطر *A. niger* من اوراق نبات الباقلاء المصابة بمرض Chocolate Spot المتسبب عن الفطر *Botrytis fabae* ، إذ اظهرت العديد من عزلات الفطر امكانية تثبيط الفطر *B. fabae* من خلال انتاج المضادات الحياتية و تحليل مايسيليوم الفطر الممرض . ذكر Devaki و Seema (2012) التاثير التثبيطي للفطر *A. niger* على الفطر *Rhizoctonia solani* حيث سجل فرقا معنويا من خلال نسبة التثبيط التي و صلت الى 58% خلال اربعة ايام ، كما اكد Vaish و Sinha (2006) بأن جميع عزلات الفطر *A. niger* من التربة و المحيط الجذري لنبات الرز المصاب بمرض Sheath Blight of Rice و الناتج عن الفطر *R. solani* قد اظهرت نشاطا تثبيطيا عاليا ضد مايسيليوم الفطر الممرض من خلال انتاج مواد ايضية سامة ، و ايضا لوحظ نمو الفطر *A. niger* على المايسيليوم و الاجسام الحجرية للفطر *R. solani* و كذلك الالتفاف حول الخيط الفطري للممرض مكونا تركيب يشبه العقدة في منطقة الاختراق .

وجد Alwathnani و Perveen (2012) ان الفطر *A. niger* سجل اعلى نسبة تثبيط للفطر *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* من بين فطريات التضاد الاخرى ، كما وجد ان اعلى ارتفاع لنبات الطماطا كان عند معاملتها مع الفطر *A. niger* . كما وجد Lee و

آخرون ، (2002) عند استخدام اختبار التضاد ان الفطر *A. niger* قد ثبط نمو الفطر *F. udum* بنسبة 88.4% . لاحظ Adebola و Amadi، (2010) ان الفطر *A. niger* كان الاكثر تثبيطا للفطر الممرض *Phytophthora palmivora* الذي يصيب نبات الكاكاو .

اوضح Dharmaputra و أخرون (2003) امكانية الفطر *A. niger* العالية في تثبيط الفطر *A. flavus* المنتج لسم Aflatoxin نوع B اما بواسطة الاوساط الصلبة او بواسطة الاوساط الحاوية على رواشح الفطر *A. niger* ، اذ وصلت نسبة تثبيط انتاج السم الى 100% عند احتواء الرواشح على معلق كونيدي مركز .

2 –7– 2. استخدام الفطر *Aspergillus terreus* Thom في المكافحة الاحيائية

يملك الفطر *A. terreus* امكانية انتاج عالية للمركبات الايضية الثانوية المهمة في التقنيات الحيوية و خصوصا في المجال الزراعي ، اذ تم تحديد ثلاثة مركبات مضادة للفطريات سجل اثنان منها تثبيطا عاليا ضد الفطر *A. fumigates* (Awaad و أخرون 2012) . يمكن عزل الفطر *A. terreus* من التربة باستخدام تقنية Sclerotial Bait Technique و اختبار فعاليته التضادية بطريقة الزرع المزدوج ضد الفطر *S. sclerotiorum* ، اذ سجل درجة عالية من التضاد و النمو على الفطر الممرض ، كما اثر على قابلية نمو الاجسام الحجرية بنسبة 100%عندما تم معاملتها بالعالق الكونيدي للفطر *A. terreus* ، إذ تمكن الفطر *A. tereeus* من تكوين مستعمرة على الاجسام الحجرية الداخلية و اختراق الطبقة الداخلية للجسم الحجري ، و ايضا تم ملاحظة انحلال الغشاء البلازمي في بعض الخلايا المصابة بالفطر *A. terreus* (Melo و آخرون ، 2006) تحتوي رواشح الفطر *A. terreus* على مضادات حيوية ثبطت نمو البكتريا *Bacillus mycoides* (Grossbard، 1952) .

2 –7– 3 . استخدام الفطر *Penicillium sp.* في المكافحة الاحيائية

وجد ان للفطر *Penicillium sp.* دوراً مهما في عملية تحطيم الجسم الحجري للفطر *S. sclerotiorum* (Willetts و Wong ، 1980). اوضح Thanaboribat و آخرون (2011) بأن الخلاصة الخام للفطر *Penicillium sp.* اعطت تثبيطا عاليا ضد الفطر *A. flavus*. بين Alam و آخرون (2010) ان الفطر *Penicillium sp.* و الذي عزل من جذور نبات الملفوف قد اختزل النمو الشعاعي للفطر *F. oxysporum f. sp. lycopersici* المسبب لأمراض الذبول في نباتات الطماطم و الملفوف عند استخدام تقنية الزرع المزدوج بدون حدوث

تلامس بين الخيوط الفطرية بسبب انتاج الفطر *Penicillium sp.* لبعض المركبات المضادة للفطريات ، كما سجل العالق الكونيدي بتركيز 10^6 عند مزجه في الاصص انخفاضا ملحوظا في شدة المرض ، و قد ادى الفطر *Penicillium sp.* الى زيادة انبات البذور و نمو البادرات .

اكد Singh و Singh (2011) ان استخدام الفطر *Penicillium sp.* في مكافحة الذبول في نبات البطيخ الناتج عن الفطر *F. oxysporum* قد وفر حماية للأزهار من الذبول ، كما سجلت النباتات المعاملة بالفطر اعلى حاصل . اشار Prince و آخرون (2011) الى امكانية الفطر *P. chrysogenum* و *P. citrinum* على تثبيط الفطر الممرض *Colletotrichum falcatum* المسبب لمرض Red Rot في قصب السكر . اثبت الفحص المجهري باستخدام المجهر الضوئي و المجهر الالكتروني الماسح القدرة التطفلية للفطر *P. oxalicum* على الفطر الممرض *Alternaria alternate* تحت جميع الظروف البيئية ، اذ شوهد تطفل الفطر *P. oxalicum* على تراكيب تكاثرية مختلفة من الفطر الممرض (Sempere و Santamarina ، 2010). ذكر Santamarina و أخرون (2002) بأن جميع عزلات الفطر *P. oxalicum* و الفطر *P. decumbens* قد ثبطت البكتريا مثل *B. subtilis* و *Streptococcus pyogenes* و *Staphylococcus aureus* و *Streptomyces albus* .

بين Ownley و Benson (1992) امكانية السيطرة على الفطر الممرض *Phytophthora cinnamomi* ، اذ انخفض انتشار الفطر الممرض عند تلقيح الوسط الزرعي بنخالة الحنطة الحاوية على الفطر *P. janthinellum* ، كذلك اختزل الفطر *P. janthinellum* النمو الشعاعي للفطر *P. cinnamomi* في وسط زرعي حامضي حيث توقف الفطر الممرض عن النمو بعد سبعة ايام من الحضن ، في حين استمر الفطر *P. janthinellum* بالنمو فوق الفطر *P. cinnamomi* ليغطي الطبق بشكل كامل .

2 –7– 4 . استخدام الفطر *Trichoderma harzianum* Rifai في المكافحة الأحيائية

تعد انواع الفطر *Trichoderma* من اكثر عوامل المكافحة الاحيائية نشاطا ضد الفطريات النباتية الممرضة و خاصة السلالات التي تمتلك قابلية نوعية للسيطرة على مدى من الممرضات تحت ظروف بيئية متباينة ، و علاوة على ذلك فهي تعد من محتويات المحيط الجذري إذ تستعمر الجذور لتوفير الحماية للنبات ، كما تستخدم انواع الفطر *Trichoderma*

الية Mycoparasitism و هي من اكثر الاليات التي يلازمها انتاج الانزيمات المحللة للجدار الخلوي الخاص بالممرضات (Anand وReddy ، 2009) .

يوصف الفطر *T. harzianum* على انه اكثر انواع *Trichoderma* اهمية في المكافحة الاحيائية ، اذ يملك عدد من الجينات التي لها دور في تحطيم الجدار الخلوي للممرضات مثل Tri5 Gene المسؤول عن انتاج Trichothecene الذي يثبط انتاج DNA و البروتين في خلايا الممرضات و من ثمّ تثبيط نموها ، و ايضا الجين المسؤول عن ايقاف انتاج انزيم Cellulase و Xylanase في الجدار الخلوي للممرض ، و ايضا الجين المسؤول عن انتاج انزيم Serine Protease و هو من اهم عوامل نجاح الفطر *T. harzianum* في المكافحة الاحيائية (Sharma و آخرون ، 2011) تبين اثناء استخدام الفطر *T. harzianum* في مكافحة عدد من الممرضات الموجودة في التربة زيادة في نمو النباتات و المحاصيل نتيجة انخفاض الامراض النباتية ، كما يعمل على خفض تكاليف انتاج المحاصيل الزراعية و ايضا خفض التأثيرات البيئية من خلال التقليل من استخدام المبيدات الفطرية و منظمات النمو النباتية (Pandya و Saraf، 2010) .

اوضح Junior و آخرون، (2009) ان الفطر *T. harzianum* قد ثبط نمو الفطر *S. sclerotiorum* بشكل كامل باستعمال اختبار التضاد . و بين Zamani و آخرون ،(2009) امكانية تثبيط الفطر *S. sclerotiorum* باستعمال سلالة من الفطر *T. harzianum* منتجة للأنزيم Chitinase و β-1,3 glucanase بمستويات عالية بعد اربعة ايام من الحضن . اشار Jonesو Stewart ،(2000) الى عزل الفطر *T. harzianum* من حقول الخضراوات و من تربة مصابة بالفطر *S. sclerotiorum* في نيوزلندا او بصورة مباشرة من الجسم الحجري ، حيث تمكن الفطر *T. harzianum* من اختزال حيوية الاجسام الحجرية بعد اربعة اسابيع من الحضن .

ذكر Rabeendran و آخرون ،(1998) دور الفطر *T. harzianum* في تثبيط نمو الفطر *S. sclerotiorum* و انتاج الاجسام الحجرية في الحبوب و الطماطم و الخس ، كذلك وفر حماية ضد اصابة بادرات الخيار و الخس بالفطر *S. sclerotioru* . اوضح Amin و آخرون، (2010) اهمية المركبات الايضية التي ينتجها الفطر *T. harzianum* في تثبيط النمو الشعاعي لعدد من الفطريات الممرضة مثل *S. rolfsii* و *C. capsici* و *H. oryzae* و *A. alternate* ، كما ذكر Benzohra و أخرون، (2011) ان الفطر *T. harzianum* ثبط نمو مايسيليوم الفطر *Ascochyta rabiei* الذي يصيب الحمص بعد سبعة ايام من اجراء اختبار التضاد ، و ايضا تمكن راشح الفطر *T. harzianum* عند اضافته بتراكيزه الثلاثة 10 و 20 و 30% الى

انخفاض معنوي في النمو و الوزن الجاف للفطر *Macrophomina phaseolina* و الفطر *F. solani* المسببة لموت بادرات الحمص.

2 – 8. دور العناصر الغذائية و الرقم الهيدروجيني pH في أنتاج حامض الأوكزاليك في الفطر *S. sclerotiorum*

تعد المغذيات المواد الاساسية المستخدمة في عمليات البناء الحيوي و تحرير الطاقة كما تساهم بشكل كبير في تحفيز نجاح بقاء أي كائن حي على قيد الحياة ، و يعد مصدر الغذاء عاملا محددا لنمو شدة امراضية الفطريات الممرضة للنبات (Safavi و آخرون ،٢٠٠٧)، فالعناصر الغذائية الكبرى مثل الكاربون و النيتروجين و الاوكسجين و الهيدروجين و الكبريت و الفسفور هي مكونات مكملة للكاربوهيدرات و الدهون و البروتينات و الاحماض النووية و جميع هذه المكونات تعمل على تنشيط عمليات انتاج المواد الايضية و التي توجد بصورة مباشرة او غير مباشرة في التفاعلات بين الممرض و العائل (Cochrane ، ١٩٥٨) ، و ايضا تكون موجودة في اليات الدفاع الذاتي و الوسائل التي تمكن الكائن الحي من مواجهة الظروف البيئية المختلفة (Tanrikut و Vaughan ، ١٩٥١) ، لقد وجد ان عدد من مصادر الكاربون و من ضمنها ما موجود في الجدار الخلوي للنبات على اعتبار انه مصدر الكاربون الوحيد يمكن ان تساهم في تراكم حامض الاوكزاليك بوصفه عامل امراضية مهم في الفطر *S. sclerotiorum* ، كما تبين ايضا ان الكاربوهيدرات البسيطة و المتعددة قد عملت على تحفيز النمو و صناعة الاوكزالات في الفطر *S. sclerotiorum* (Bryan و أخرون ، ٢٠٠٧) ، اما النتروجين فهو يعد عنصر اساسي في تركيب و حيوية الفطريات ، حيث تبين ان الفطريات النامية في وسط حاوي على النترات قد انتجت كميات كبيرة من حامض الاوكزاليك ، بينما الفطريات النامية في وسط يحتوي على الامونيوم فقد انتجت مقادير صغيرة من حامض الاوكزاليك (Willetts و Wong ، 1980) ، و او ضحت الدراسات ان الاحماض الامينية تمثل اكثر مصادر النايتروجين اهمية بالمقارنة مع النترات و الامونيوم ، و في ما يخص الرقم الهيدروجيني pH لوسط النمو فقد تبين انه مهم جدا للفطر *S. sclerotiorum* ، اذ بامكان الفطر تحمل مدى واسع من pH إلا ان افضل pH للنمو و تكوين الاجسام الحجرية يتراوح بين 4 – 5.5 ، كما وجد ان pH الوسط الزرعي منظم قوي لإنتاج حامض الاوكزاليك حيث يزداد انتاج الحامض في البيئة الحامضية و اوضحت بعض الدراسات أنّ انتاج حامض الاوكزاليك في الفطر *S. sclerotiorum* يتم تحفيزه بوساطة انزيم Oxaloacetate Acetylhydrolase و ان نشاط الانزيم يزداد مع زيادة pH البيئة المحيطة (Mwangi و آخرون، 2012) .

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Chapter Three

Materials & Methods

الفصل الثالث

المواد و طرائق العمل

3 – 1. المواد و الاجهزة المستخدمة

الجدول (1) يبين المواد الكيميائية المستخدمة

اسم المادة		الشركة المصنعة
1. اكار – اكار	Agar-Agar	HIMEDIA- India
2. وسط اكار البطاطا و الدكستروز	PDA	HIMEDIA-India
3. دقيق الشوفان	Oat Meal	تجاري
4. وسط سابرويد دكستروز اكار	SDA	HIMEDIA- India
5. برمنغنات البوتاسيوم	$KMnO_4$	GCC-England
6. هايبوكلورات الصوديوم	NaOCl	تجاري
7. كلوروفورم	$CHCl_3$	Scharlau-Spain
8. يوديد البوتاسيوم	KI	Merk-Germany
9. هيدروكسيد الصوديوم	NaOH	Sdfine-Mumbai
10. حامض الهيدروكلوريك	HCl	HIMEDIA-India
11.الفا – نفثول	$C_{10}H_9OH$	HIMEDIA-India
12. خلات الرصاص	$Pb(CH_3COO)_2$	Thomas Beaker
14. كلوريد الحديديك	$FeCl_3$	HIMEDIA-India
15. ميثانول	CH_3OH	HIMEDIA-India
16. امونيا	$NH_3 . H_2O$	Sinophrma
17. كلوريد الزئبقوز	$HgCl_2$	Sigma-USA

18. حامض الكبريتيك	H_2SO_4	HIMEDIA-India
19. بلورات الفينول	C_6H_5OH	Thomas Beaker
20. ايثانول	C_2H_5OH	Scharlau-Spain
٢١. المثيلين الأزرق	$C_{16}H_{18}N_3SCl$	-
٢٢. كليسيرول	$C_3H_5(OH)_3$	-
٢٣. حامض اللاكتيك	$C_3H_6O_3$	-
٢٤. سكروز	$C_{12}H_{22}O_{11}$	-
٢٥. نترات الصوديوم	$NaNO_3$	-
٢٦. فوسفات ثنائي البوتاسيوم	K_2HPO_4	-
٢٧. كبريتات المغنيسيوم	$MgSO_4$	-
٢٨. كلوريد البوتاسيوم	KCl	-
٢٩. كبريتات الحديد	$FeSO_4$	-
٣٠. الكلورامفينيكول		Indofarma
٣١. مرشح Millipore		Sartorius Stedim Biotech - Germany

الجدول (2) يبين الأجهزة المستخدمة

اسم الجهاز	الشركة المصنعة
1. حاضنة Incubator	DAIHAN Lab Tech-Korea
2. جهاز تقطير الماء Distillation Apparatus	DAIHAN Lab Tech-Korea
3. ميزان حساس Analytical Balance	Sartorius-Germany
4. مجهر ضوئي Light Microscope	Humascope-Germany
5. مؤصدة Autoclave	Allamerican-USA
6. مقياس الرقم الهيدروجيني pH Meter	Hanna-Portugal
7. مفرغ هوائي Vacuum Pump	Yangyi
8. خلاط كهربائي Blender	Jlassco-India
9. فرن كهربائي Electrical Oven	Heraeus
10. غرفة تعقيم Laminar Flow	DAIHAN Lab Tech-Korea
11. حجرة تلقيح Hood	Tianjin Taisite-China
١٢. حمام مائي Water Bath	-
13. مصدر الاشعة فوق البنفسجية UV Transilluminator	Cleaver Scientific-Germany

3 – 2. الاوساط الزرعية المستخدمة

3 – 2 – 1. وسط البطاطا دكستروز أكار Potato Dextrose Agar (PDA)

حضر الوسط الجاهز حسب توصيات شركة HIMEDIA – India بإذابة 39 غم من مسحوق وسط البطاطا دكستروز اكار في كمية من الماء المقطر و أكمال الحجم للوصول الى لتر واحد . اضيف الى الوسط المضاد الحيوي Chloramphenicol بمقدار 250 ملغم/لتر ثم وزع في دوارق زجاجية سعة 250 مل و سدت فوهاتها بسداد قطني محكم و عقمت بالمؤصدة بدرجة

حرارة 121 °م و ضغط 15 باوند / إنج^2 لمدة 20 دقيقة بعدها ترك الوسط ليبرد و عدّل pH الوسط الى ٧ ثم صب في اطباق بتري بحسب الغرض من التجربة .

3 – 2 – 2. وسط الزابك Czapek Dox Agar

حضر الوسط بحسب الطريقة الواردة في Tuite (1969) و ذلك بإذابة 20 غم من الأكار – أكار في 500 مل من الماء المقطر في دورق زجاجي ، و أذيبت باقي مكونات الوسط و التي تشمل 30 غم سكروز و 2 غم $NaNO_3$ و 1 غم $K_2 HPO_4$ و 0.5 غم من $MgSO_4$ و 0.5 غم من KCl و 0.01 غم من $FeSO_4$ في 400 مل من الماء المقطر في دورق زجاجي ثاني ، بعد ذلك مزجت محتويات الدورقين في دورق زجاجي واحد و اكمل الحجم الى 1 لتر . اضيف الى الوسط المضاد الحيوي Chloramphenicol بمقدار 250 ملغم/لتر ثم وزع في دوارق زجاجية سعة 250 مل و سدت فوهتها بسداد قطني محكم و عقمت كما في الفقرة (3 – 2 –1) بعدها ترك الوسط ليبرد و عدّل pH الوسط الى ٧ ثم صب في اطباق بتري بحسب الغرض من التجربة .

3 – 2 – 3. وسط الشوفان Oat Agar

حضر الوسط باذابة 50 غم من دقيق الشوفان مع 18 غم من الأكار – أكار في 1 لتر من الماء المقطر . اضيف الى الوسط المضاد الحيوي Chloramphenicol بمقدار 250 ملغم / لتر ثم وزع في دوارق زجاجية سعة 250 مل و سدت فوهاتها بسداد قطني محكم و عقمت كما في الفقرة (3 – 2 – 1) بعدها ترك الوسط ليبرد و عدّل pH الوسط الى ٧ ثم صب في اطباق بتري بحسب الغرض من التجربة (Melo و آخرون ، 2006) .

3 – 2 – 4. وسط سابرويد دكستروز اكار Sabrouaud Dextrose Agar (SDA)

حضر الوسط الجاهز حسب توصيات شركة HIMEDIA – India بإذابة 65 غم من مسحوق الوسط في كمية من الماء المقطر و اكمال الحجم الى لتر واحد . اضيف الى الوسط المضاد الحيوي Chloramphenicol بمقدار 250 ملغم / لتر ثم وزع في دوارق زجاجية سعة 250 مل و سدت فوهاتها بسداد قطني محكم و عقمت كما في الفقرة (3 – 2 – 1) بعدها ترك الوسط ليبرد و عدّل pH الوسط الى ٧ ثم صب في اطباق بتري بحسب الغرض من التجربة .

3 – 2 – 5. وسط مستخلص البطاطا و الدكستروز السائل Potato Dextrose Broth (PDB)

حضر الوسط بغلي 200 غم من قطع البطاطا بعد غسلها و تقطيعها الى قطع صغيرة في 500 مل من الماء المقطر و لمدة 20 – 30 دقيقة ، و بعد انتهاء مدة الغليان رشح المخلوط بواسطة قطعة من القماش للحصول على المستخلص . أذيب 20 غم من الدكستروز في 500 مل من الماء المقطر ثم أضيف له راشح البطاطا و أكمل الحجم الى 1 لتر . أضيف الى الوسط المضاد الحيوي Chloramphenicol بمقدار 250 ملغم / لتر ثم وزع في دوارق زجاجية سعة 500 و بواقع 300 مل من الوسط السائل في كل دورق و سدت فوهاتها بسداد قطني محكم و عقمت كما في الفقرة (3 – 2 – 1) و عدّل pH الوسط الى ٧ .

3 – 3. المحاليل و الصبغات المستخدمة

3 – 3 – 1. صبغة اللاكتوفينول أزرق المثيلين

حضرت الصبغة على وفق Ellis (1994) من 0.05 غم المثيلين الازرق و 20 غم بلورات الفينول و 40 مل كليسيرول و 20 مل حامض اللاكتيك و 20 مل ماء مقطر ، و تستعمل لتصبيغ الفطريات و تثبيتها لغرض الفحص المجهري .

3 – 3 – 2. محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH

تم تحضيره من إذابة 8 غم من هيدروكسيد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر ، واستخدم لتعديل الأس الهيدروجيني للأوساط المستخدمة .

3 – 3 – 3. محلول حامض الهيدروكلوريك HCl (5) عياري

حضر هذا المحلول حسب التعليمات الخاصة بالشركة المصنعة و استخدم لغرض تعديل الأس الهيدروجيني للأوساط الزرعية المستخدمة .

3 – 3 – 4. محلول برمنغنات البوتاسيوم $KMnO_4$ (0.02) عياري

حضر المحلول بإذابة 0.316 غم من مسحوق برمنغنات البوتاسيوم في كمية كافية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى 100 مل من الماء المقطر ، و استعمل المحلول لتقدير النسبة المئوية لحامض الأوكزاليك المنتج من قبل الفطر *S. sclerotiorum* .

3 – 4. طرائق العمل

3 – 4 – 1. عزل الفطر الممرض *S. sclerotiorum*

تم الحصول على عزلة الفطر الممرض *S. sclerotiorum* من مختبر الدراسات العليا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء و المشخص من قبل محمد و المظفر، (2013) وفقا لتقانة الـ PCR و التي تعود للسلالة MCG Mycelia Compatibility Groupings و عند التتابع 475 bp و للمنطقة (ERIC) Entrobacterial Repetitive Intergenic .

3 – 4 – 2. تنمية الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*

نميت الاجسام الحجرية من خلال نقل قرص قطره 5 ملم بواسطة الثاقب الفليني Cork Borer من حافة مستعمرة نقية للفطر *S. sclerotiorum* بعمر 5 ايام الى اطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي PDA ، ثم حضنت الاطباق بدرجة 20 ± 2 °م لمدة 15 يوم في حاضنة مبردة حتى اكتمال تكوين الاجسام الحجرية (Ibarra-Medina و آخرون، 2010) .

3 – 4 – 3. عزل و تشخيص بعض الفطريات المرافقة للأجسام الحجرية

تم عزل الفطريات المرافقة للجسم الحجري للفطر *S. sclerotiorum* بأستخدام تقانة مصيدة الأجسام الحجرية Sclerotia-Trap Technique وهي طريقة معتمدة للحصول على الفطريات التي تمتلك قابلية تضادية اتجاه الفطر *S. sclerotiorum* ، إذ جلبت تربة من حقل مزروع و وضعت كمية منها في علب زجاجية (3/4 حجم العلبة تقريبا) ، بعد ذلك تم تعقيم

الأجسام الحجرية التي تم الحصول عليها كما جاء في اعلاه سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم التجاري (6%) بتركيز 2% لمدة 5 دقائق و غسلت الاجسام الحجرية بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات ، ثم غرست في العلب الزجاجية بمعدل 20 جسم حجري لكل علبة على عمق 2 سم و حضنت بدرجة حرارة 20 مº ± 2 مº، بعد ذلك استخرج 5 جسم حجري بعد 48 ساعة و 72 ساعة و 96 ساعة من الحضن ، حيث غسلت بالماء المقطر المعقم لإزالة بقايا التربة ثم وضعت في اطباق بتري الحاوية على الوسط PDA و حضنت الاطباق بدرجة 20 ± 2 مº لحين ظهور الفطريات المضادة للجسم الحجري . و بعد ظهور مستعمرات فطرية حول الجسم الحجري تم تنقيتها و زراعتها على وسط PDA و وسط Czapek Dox Agar و شخصت بحسب المفاتيح التصنيفية الواردة في (Neill ، 1937 ؛ Thom و Raper ، 1945) و نتيجة لتجارب سابقة تم اختيار الفطريات التي لها قابلية تضادية اتجاه الفطر *S. sclerotiorum* و هي : *A. niger* ، *A. terreus* و *Penicillium sp.* (Ibarra-Medina و آخرون، 2010) ، بعدها حسبت النسبة المئوية للظهور % occurrence باستخدام المعادلة التالية (Booth و آخرون، 1988) :

$$\text{النسبة المئوية للظهور} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها الجنس او النوع}}{\text{عدد العينات المستخدمة في الدراسة}} \times 100$$

3 – 4 – 5. الفطر *T. harzianum*

تم الحصول على الفطر *T. harzianum* من قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بابل و شخص اعتمادا على الصفات التصنيفية الواردة في Kubicek و Harman (2002).

3 – 5. تأثير الرواشح الخام للفطريات المعزولة من الأجسام الحجرية و راشح الفطر *T. harzianum* على النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum*

3 – 5 – 1. تحضير الرواشح الخام للفطريات

حضرت الرواشح الخام للفطريات من خلال تهيئة أربعة دوارق زجاجية سعة 500 مل يحوي كل منها على 300 مل من الوسط الغذائي السائل Potato Dextrose Broth و المحضر وفقا لما جاء في الفقرة (3 – 2 –5) ، لقح كل دورق بقرصين قطر 1 سم من حافة مستعمرة الفطريات النامية بعمر 5 ايام في الوسط الغذائي PDA و بواقع اربعة دوارق لكل فطر . حضنت الدوارق بدرجة حرارة 25 ± 2 °م لمدة ١٤ يوم مع مراعاة رج القناني يوميا ، و بعد انتهاء مدة الحضن فصل الغزل الفطري باستخدام اوراق ترشيح Whatman No. 1 ، و بعد ذلك تم امرار الرواشح عبر مرشح الـ Millipore (0.45 مايكروميتر) مجهزة من شركة Sartorius Stedim Biotech - Germany بمساعدة جهاز التفريغ الهوائي Vacuum Pump و جمعت الرواشح في دوارق زجاجية معقمة كل منها على حدة و تحت ظروف التعقيم ، ثم حفظت الرواشح في الثلاجة لحين الاستعمال (Melo و آخرون، 2011) .

3 – 5 – 2. اختبار تأثير الرواشح الخام للفطريات على النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum*

اضيفت رواشح الفطريات حتى اكمال ١٠٠ مل من حجم الوسط الغذائي PDA المعقم قبيل مرحلة التصلب و بالنسب 15% ، 30% ، 45% ، 60% و بشكل منفرد مع تعديل نسبة الأكار المضاف للوسط الغذائي ، صبت الاوساط الحاوية على رواشح الفطريات التضادية في اطباق بتري و كررت كل معاملة اربع مرات مع وجود معاملة السيطرة للفطر الممرض على الوسط الغذائي PDA غير المعامل بأي راشح ، ثم لقحت الأوساط الحاوية على الرواشح بعد تصلبها بأخذ أقراص قطر كل منها 5 ملم بواسطة الثاقب الفليني Cork Borer من الوسط الغذائي PDA النامي عليه الفطر الممرض و بعمر 5 ايام . حضنت الاطباق بدرجة حرارة 20± 2 °م و بعد وصول نمو الفطر الممرض في معاملة السيطرة الى حافة الطبق تم قياس قطر المستعمرة الفطرية النامية (معدل قطرين متعامدين) ، و سجلت النتائج و حسبت نسبة التثبيط المئوية باستخدام المعادلة الآتية (الكعبي و اخرون ، 2010) :

معدل قطر المستعمرة في أطباق السيطرة — معدل قطر المستعمرة في اطباق المعاملة

النسبة المئوية للتثبيط = -- X 100

3 – 6. دراسة بعض الخصائص الكيميائية و الفيزيائية للرواشح الفطرية المعزولة من الأجسام الحجرية و الفطر *T. harzianum*

استخلصت الرواشح الخام للفطريات A. *niger* ، *A. terreus* ، *Penicillium sp.* و *T. harzianum* من خلال تهيئة اربعة دوارق زجاجية سعة 250 مل يحتوي كل منها 150 مل من الوسط الغذائي السائل PDB المحضر وفقا لما جاء في الفقرة (3 – 2 – 5) ، لقح كل دورق بثلاثة اقراص قطرها 5 ملم اخذت بواسطة ثاقب الفلين Cork Borer من حافات مستعمرات الفطريات النامية في الوسط الغذائي PDA بعمر خمسة ايام و بواقع اربعة دوارق لكل فطر حضنت الدوارق بدرجة حرارة 25 ± 2 °م لمدة 14 يوم مع مراعاة رج الدوارق يوميا . و بعد انتهاء مدة الحضن فصل الغزل الفطري باستخدام اوراق الترشيح Whatman No. 1 و بعد ذلك تم امرار راشح كل فطر على حدة من خلال مرشح الـ Millipore (0. 45 مايكروميتر) مجهزة من شركة Sartorius Stedim Biotech - Germany إذ جمع راشح كل فطر في دورق زجاجي معقم سعة 500 مل و تحت ظروف معقمة ، بعدها وضعت رواشح الفطريات في قمع الفصل كل منها على حدة و اضيف اليه الكلوروفورم بحجم مساوي لحجم الراشح (1 : 1) ثم رج قمع الفصل جيدا لحين تكون طبقتين ، بعدها جمع المستخلص المتبقي و جفف بدرجة حرارة 40 °م باستعمال حمام مائي لغرض الحصول على حجم 5 مل من الحجم الاصلي للمستخلص ثم حفظ المستخلص في اوعية زجاجية محكمة الاغلاق نظيفة و معقمة و مغلفة بطبقة من الالمنيوم ثم وضعت في الثلاجة لحين الاستعمال (Melo و آخرون، 2011) .

3 – 6 – 1. قياس مقدار التحرك النسبي R_f

للتأكد من وجود تشابه و اختلاف في مكونات المستخلصات الفطرية المحضرة حسب الفقرة (٣ – ٦) استخدمت تقانة صفائح كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) (Medic-Saric و آخرون، 2004) . اتبعت طريقة Mabrouk و آخرون، (2008) باستعمال صفائح TLC رقيقة مغطاة بهلام السليكا Silica

Gel بأبعاد 20 × 20 سم و سمك 2 ملم مجهزة من شركة Whatman – USA اذ تم تنشيط الصفائح بوضعها في فرن كهربائي Oven بدرجة حرارة 105 °م لمدة 30 دقيقة ، تركت مسافة 1.5 سم من حافة الصفيحة السفلى ثم تم وضع بقع صغيرة من محلول المستخلصات الفطرية التي ركزت الى 5 مل و بمقدار 10 مايكروليتر بوساطة انبوبة شعرية Capillary Tube من كل مستخلص فطري على ان تكون المسافة بين بقعة و اخرى 3 – 2 سم ، بعدها تركت لتجف ، ثم وضعت صفيحة TLC في حوض الفصل المشبع بنظام الفصل كلوروفورم : ميثانول (Chloroform : Methanol) (5 : 95) و ترك المذيب لينتشر مسافة 17 سم من موضع البقعة باتجاه الأعلى ، بعدها اخرجت الصفائح لتجف بدرجة حرارة المختبر ثم فحصت المركبات المفصولة في جهاز الاشعة فوق البنفسجية و بطول موجي 365 نانوميتر ثم حسبت قيم التحرك النسبي للبقع المفصولة Relative Flow (R_f) بحسب المعادلة الاتية :

المسافة التي قطعتها العينة المفصولة

قيمة R_f = ----------

المسافة التي قطعها المذيب

3 – 6 – ٢. الكشف عن بعض المجاميع الفعالة للمستخلصات الفطرية

اجريت مجموعة من الكشوفات النوعية و ذلك للتعرف على المكونات الكيميائية الاساسية او المركبات الفعالة الموجودة في هذه المستخلصات ، إذ تم الكشف عن وجود القلويدات ، التانينات ، الصابونينات ، الكلايكوسيدات ، الفلافونيدات ، الكاربوهيدرات ، الفينولات و كالآتي :

أ. الكشف عن القلويدات Alkaloids

- **كاشف ماير Mayer Reagent**

حضر هذا الكاشف على النحو الاتي :

1 – اضافة 1.36 غم من كلوريد الزئبقوز $HgCl_2$ في 60 مل من الماء المقطر .

2 – اذابة 5 غم من يوديد البوتاسيوم في 10 مل من الماء المقطر .

تم مزج المحلول (1) و (2) و اكمل الحجم الى 100 مل بإضافة الماء المقطر ، ثم اضيفت قطرات من هذا الكاشف الى المستخلصات الفطرية . ان ظهور راسب ابيض او عكورة يدل على وجود القلويدات (Harborne، 1984؛ Vinokurova و آخرون، 2003) .

ب. الكشف عن التانينات Tannins

- **كشف خلات الرصاص Lead Acetate Test**

حضر المحلول بإذابة 1 غم من خلات الرصاص في 100 مل من الماء المقطر ، ثم اضيفت عدة قطرات منه الى انبوبة اختبار تحوي 0.5 مل من المستخلص الفطري . ان تكون راسب ابيض هلامي القوام يدل على وجود التانينات (Ahmed و آخرون،١٩٨٩ ؛ Murugan و آخرون، 2007 ؛ Lal و آخرون، 2012) .

ج. الكشف عن الصابونينات Saponins

- **الرغوة الكثيفة**

تم تحضير محلول مائي من المستخلصات الجافة للفطريات و وضعت في انبوبة اختبار و رجت بشدة ، ان تكون رغوة كثيفة تبقى لمدة طويلة دليل على وجود الصابونينات (Harborne، 1984 ؛ Li و آخرون ، 2012) .

د. الكشف عن الكلايكوسيدات Glycosides

- **كاشف موليش Molish Reagent**

تم الكشف عن وجود الكلايكوسيدات (Clardy و آخرون، 2009 ؛ Lu و Mei، 2003) باستخدام كاشف موليش الذي حضر استنادا الى ما ذكره الشيخلي و اخرون (1993) من خلال اخذ 2 مل من المستخلص المراد اختباره و اضيفت اليه قطرتان من محلول α - naphthol و رج المحلول جيدا ، ثم مسكت الانبوبة بشكل مائل و اضيفت 2 مل من حامض الكبريتيك المركز

بشكل قطرات على جدار الانبوبة لحين ظهور طبقتين و طبقة بنفسجية اللون تفصل بين الطبقتين دليل على وجود المواد الكلايكوسيدية .

هـ . الكشف عن الفلافونيدات Flavonoids

- **كشف حامض الكبريتيك المركز**

اذيب 1 مل من المستخلص في 1 مل من حامض الكبريتيك المركز ، فظهور اللون الاصفر الداكن دليل على ان الكشف ايجابي (AL-Khazragi،1991 ؛ Koffas و آخرون، 2010) .

و. الكشف عن الكربوهيدرات Carbohydrates

- **كشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز**

حضر كاشف الفينول باذابة 25 غم من بلورات الفينول في 500 مل من الماء المقطر ، ثم اضيف 0.5 مل من هذا الكاشف الى 0.5 مل من المستخلص في انبوبة اختبار و رجت جيدا ثم اضيف 2.5 مل من حامض الكبريتيك المركز الى المحلول ، فكان ظهور اللون الاحمر البني دليلا على وجود الكربوهيدرات (Meyer و Walther، 1988 ؛ Khachatourians و آخرون، 1990).

ز. الكشف عن الفينولات Phenols

- **كاشف كلوريد الحديديك Ferric Chloride Reagent**

حضر هذا الكاشف بإذابة 1 غم من كلوريد الحديديك $FeCl_3$ في 100 مل من الماء المقطر ، رطبت ورقة ترشيح بالراشح الفطري ، ثم اضيفت قطرات من كاشف كلوريد الحديديك و تم تعريض الورقة الى بخار الامونيا ، ان ظهور اللون الازرق دليل على وجود الفينولات (Adedayo و آخرون، 2001 ؛ Packter، 1969 ؛ Bollag و آخرون، 1977) .

3 – ٧. تأثير الرواشح الفطرية في نمو الفطر *S. sclerotiorum*

تم اختبار فعالية المستخلصات الفطرية ضد الفطر *S. sclerotiorum* باستخدام طريقة انتشار القرص Disc Diffusion Method إذ اخذت مجموعة اقراص معقمة من ورق

Whatman No. 1 بقطر 6 ملم و غمرت بمقدار من محلول المستخلصات بتركيز 5 مل لكل مستخلص فطري و لمدة ساعتين تحت ظروف التعقيم ، اما اقراص السيطرة فغمرت بالكلوروفورم ، بعدها وزعت الاقراص بالتساوي في اطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي PDA ، اذ تم وضع اربعة اقراص لكل مستخلص على مسافة 1 سم من حافة الطبق مع مراعاة الضغط على الاقراص للتأكد من ثباتها ، ثم لقحت الاطباق بقرص قطره 6 ملم مأخوذ بوساطة ثاقب الفلين Cork Borer من حافة مستعمرة الفطر *S. sclerotiorum* النامي على الوسط الغذائي PDA بعمر خمسة ايام و حضنت الاطباق بدرجة حرارة 20 ± 2 °م لمدة سبعة ايام و بواقع اربعة مكررات لكل مستخلص بعدها قيست منطقة التثبيط بالملم (Melo و آخرون، 2011 ؛ Thanaboripat و آخرون، 2011 ؛ Kang و Bajpai، 2012) .

3 – ٨. اختبار الكفاءة التضادية للفطريات المعزولة من الأجسام الحجرية و الفطر *T. harzianum* ضد الفطر *S. sclerotiorum*

استخدمت طريقة الزرع المزدوج Dual Culture (Demirci و آخرون، 2011) لدراسة قدرة الفطريات *A. niger* ، *A. terreus* ، *Penicillium sp.* و *T. harzianum* في التضاد مع الفطر الممرض *S. sclerotiorum* في اطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي PDA المعقم ، حيث تم تلقيح مركز النصف الاول من الطبق بقرص قطره 1 سم مأخوذ من حافة مستعمرة الفطريات *A. niger* ، *A. terreus* ، *Penicillium sp.* و *T. harzianum* النامية في الوسط PDA بعمر خمسة ايام كلا على حدة ، اما طرف النصف الاخر من الطبق فقد لقح بقرص مماثل من الفطر *S. sclerotiorum* النامي في الوسط الغذائي PDA بعمر خمسة ايام مع الاخذ بنظر الاعتبار اجراء معاملة السيطرة لكل من فطريات التضاد و الفطر *S. sclerotiorum* وذلك بتلقيح الاطباق بدون اجراء اختبار التضاد . حضنت الاطباق بدرجة حرارة 20 ± 2 °م و بواقع ثلاثة مكررات لكل فطر من فطريات التضاد الاربعة و قيست اقطار المستعمرات بعد مدة حضانة سبعة ايام بعدها قدرت درجة التضاد بحسب مقياس (Bell و آخرون، 1982) و المكون من خمس درجات هي :

1 – الفطر المضاد يغطي الطبق بكامله .

2 – الفطر المضاد يغطي 3/4 مساحة الطبق .

3 – الفطر المضاد و الفطر الممرض يغطي كل منهما نصف مساحة الطبق .

4 – الفطر الممرض يغطي 3/4 مساحة الطبق .

5 – الفطر الممرض يغطي الطبق بكامله .

و عدّ الفطر الذي يظهر درجة تضاد 2 او اقل ذات قدرة تضادية عالية .

3 – 9. تأثير بعض العوامل البيئية في النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum* و انتاج حامض الاوكزاليك

3 – ٩ – 1. الوسط الغذائي

لدراسة تأثير الوسط الغذائي في النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum* و انتاج حامض الاوكزاليك للفطر*S. sclerotiorum* اعتمدت عدة انواع من الاوساط الغذائية هي Potato Dextrose Agar و Czapek Dox Agar و Oat Meal Agar و Sabouraud Dextrose Agar (Agnihotri و Rai، 1971) و المحضرة وفقا لما جاء في الفقرة (3 – 2) ، صبت الاوساط الغذائية بشكل منفرد في اطباق بتري و بواقع أربعة مكررات لكل وسط غذائي و بعدها لقحت الاطباق بقرص قطره 5 ملم مأخوذ بواسطة ثاقب الفلين Cork Borer من حافة مستعمرة الفطر *S. sclerotiorum* النامي على الوسط الغذائي PDA بعمر خمسة ايام و حضنت الأطباق بدرجة حرارة 20 ± 2 ، وتم تقدير نمو الفطر بأخذ معدل قطرين متعامدين من ظهر المستعمرة يمران بمركز القرص بعد خمسة و سبعة ايام من الحضن (Maxwell و Lumsden، 1970) .

3 – ٩ – 2. الرقم الهيدروجيني pH

لدراسة تأثير الرقم الهيدروجيني pH في النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum* و انتاج حامض الاوكزاليك للفطر *S. sclerotiorum* اعتمدت سلسلة من الارقام الهيدروجينية هي 5 و 5.5 و 6 و 6.5 و 7 و 7.5 بعدها وزع الوسط PDA على ستة دوارق زجاجية حجم 250 مل و بعد تعقيمها بجهاز التعقيم البخاري عدلت الأرقام الهيدروجينية للأوساط تحت ظروف التعقيم الى الأرقام 5 و 5.5 و 6 و 6.5 بإضافة قطرات من حامض الهيدروكلوريك HCL (5 عياري) و الى الأرقام 7 و 7.5 بإضافة قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH المخفف صبت الاوساط في اطباق بتري و بواقع أربعة مكررات لكل رقم هيدروجيني و بعد تصلب

الوسط في الأطباق لقحت بقرص قطره 5 ملم مأخوذ بواسطة ثاقب الفلين Cork Borer من حافة مستعمرة الفطر *S. sclerotiorum* النامي على الوسط الغذائي PDA بعمر خمسة أيام و حضنت الأطباق بدرجة حرارة 20 ± 2 °م و تم قياس نمو الفطر بحسب الطريقة الواردة في الفقرة (3 – 8 – 1) بعد خمسة و سبعة أيام من الحضن (Maxwell و Lumsden، 1970) .

٣ – ٩ – ٣. تقدير النسبة المئوية لحامض الأوكزاليك Oxalic Acid

وتم تقدير النسبة المئوية لحامض الاوكزاليك من الفطر *S. sclerotiorum* النامي على وفق ما جاء في الفقرة (3 – 8 – 1) و الفقرة (3 – 8 – 2) ، إذ تم تقطيع الوسط الزرعي النامي عليه الفطر بعمر سبعة أيام بواسطة سكين معقمة على شكل قطع صغيرة بعدها نقلت القطع بواسطة ابرة معقمة الى خلاط كهربائي يحتوي على 25 مل ماء مقطر معقم لكل طبق و من ثم مزج الخليط لمدة عشر دقائق بعدها تم ترشيح المزيج بواسطة ورق ترشيح ثم اخذ الراشح و وضع في دوارق معقمة حجم 100 مل و كل دورق يحتوي 25 مل من الراشح استنادا الى Maxwell و Lumsden، (1970). و بعد ذلك قدرت النسبة المئوية لحامض الأوكزاليك Oxalic Acid وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Bateman و Beer ، (1965) بواسطة التسحيح مع برمنغنات البوتاسيوم $KMnO_4$ (0.02 عياري) حتى ظهور اللون الوردي و حسبت النسبة المئوية للحامض على اساس ان كل 1 مل من برمنغنات البوتاسيوم (0.02 عياري) تعادل 1.2653 ملغم لحامض الأوكزاليك .

النسبة المئوية لحامض الأوكزاليك = الحجم المستهلك من البرمنغنات × 1.2653

3 – ١٠. التحليلات الاحصائية

حللت نتائج التجارب وفق نموذج التجارب العاملية بالتصميم العشوائي التام Completely Randomized Design و بواقع أربعة مكررات ، و قد استخدم اختبار اقل فرق معنوي (L.S.D.) و على مستوى احتمالية 0.05 (الإمام، 2007) .

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Chapter Four

Results & Discussion

الفصل الرابع

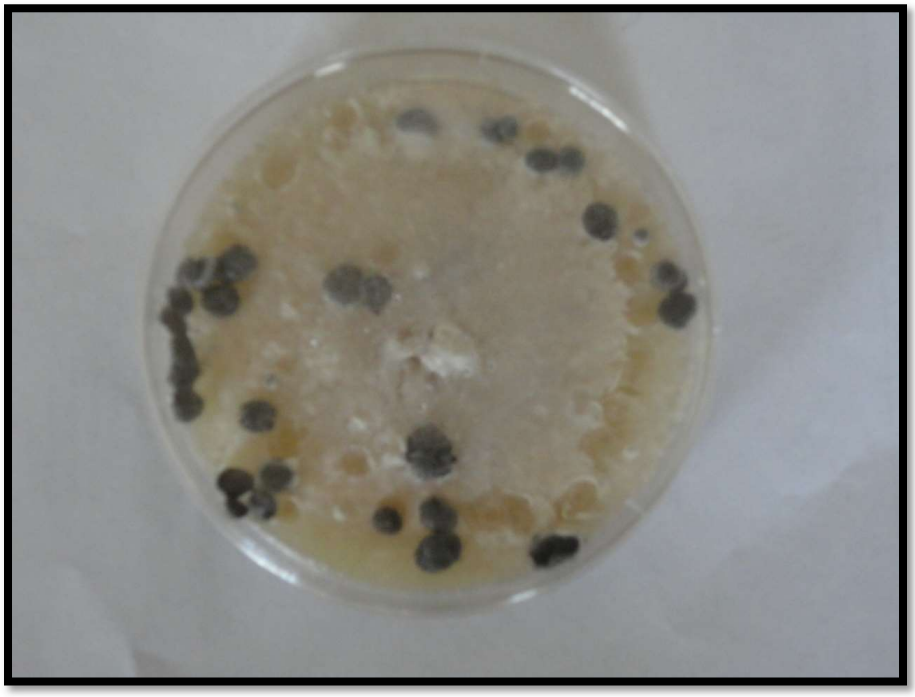
النتائج و المناقشة

4 – 1. بعض الصفات المظهرية للأجسام الحجرية الناتجة على وسط PDA

تم الحصول على الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* باعداد و احجام مختلفة على وسط PDA ، اذ تراوح عدد الاجسام الحجرية بين 4 – 42 جسم حجري ، اما الاحجام فقد تراوحت بين 0.2 – 2.5 سم^{3} ، كما ظهرت بلون اسود و شكل بيضوي مقعر او دائري مقعر غير منتظم و قد تكونت على محيط الطبق . بالإضافة الى توزيع الاجسام الحجرية بنمط منتظم او غير منتظم كما في الشكل (١) و (٢) و الذي يعود الى الظروف الغذائية وكذلك طبيعة العزلة نفسها و هذه النتائج تتفق مع (Cuong و Dohroo، 2006 ؛ Ojaghian، 2009 ؛ Meng و آخرون، 2011 ؛ Willetts و Wong، 1980)

يعد نمط توزيع الاجسام الحجرية من العوامل المؤثرة في المكافحة الاحيائية لعزلة الفطر *S. sclerotiorum* التي تمتلك هذه الميزة ، إذ وجد أنّ فطر المكافحة الاحيائية *T. harzianum* يكون اكثر كفاءة في التطفل على الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* و استعمالها مصدرا غذائيا عند وجود الاجسام الحجرية بنمط التوزيع المنتظم و تنخفض الكفاءة عند وجود الاجسام الحجرية بنمط التوزيع غير المنتظم (Knudsen و Bae، 2007) . ان قدرة الاجسام الحجرية على مقاومة الظروف البيئية القاسية مثل الاشعة فوق البنفسجية و هجمات الاحياء الدقيقة في التربة و في اثناء الهضم من قبل الحيوانات تعود الى وجود العديد من الطبقات المحاطة بالميلانين (Bashi ، 2011) .

شكل (١) نمط التوزيع المنتظم للأجسام الحجرية لفطر *S. sclerotiorum* على وسط PDA بدرجة حرارة 20 ± 2 ºم بعد 15 يوم من الحضانة .



شكل (٢) نمط التوزيع غير المنتظم للأجسام الحجرية لفطر *S. sclerotiorum* على وسط PDA بدرجة حرارة 20 ± 2 ºم بعد 15 من الحضانة .

4 – 2. الفطريات المرافقة للأجسام الحجرية

أوضحت نتائج عزل و تشخيص الفطريات المرافقة للجسم الحجري في الجدول (٣) وجود الفطر *A. niger* بنسبة ظهور 25% خلال 48 ، 72 و 96 ساعة ، *A. terreus* بنسبة ظهور 25% خلال 48 ، 72 و 96 ساعة و *Penicillium sp.* بنسبة ظهور 0% خلال48 ، 72 و 5% خلال 96 ساعة ، و هذه النتيجة تتفق مع محمد (2001) اذ تم عزل الفطر *A. niger* ، *A. terreus* و *Penicillium sp.* من الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* ، و كذلك تتفق هذه النتيجة مع Dhliwayo (2008) فقد تمكن من عزل الفطر *A. niger* و *Penicillium sp.* من التربة المصابة بالفطر *S. sclerotiorum* ، و ايضا تتفق هذه النتيجة مع Melo و آخرون، (2006)حيث قاموا بعزل الفطر *A. terreus* من الجسم الحجري للفطر *S. sclerotiorum* باستخدام تقنية Sclerotial Trap-Technique ، و هذه النتيجة مقاربة للدراسة التي قام بها Rai و Saxena، (1975) إذ تمكن الباحثان من عزل انواع تابعة للفطر *Aspergillus* و *Penicillium* من الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* .

يعود السبب في ظهور الفطريات المرافقة للجسم الحجري الى المخزون الغذائي الذي يحتويه ، فقد اشار Mclaren و آخرون، (1994) الى ان العديد من الفطريات و البكتريا و غيرها من احياء التربة تستخدم الجسم الحجري كمصدر للكاربون . و وجد أنّ استخدام الفطريات المرافقة للجسم الحجري في عمليات المكافحة الاحيائية قد ادى الى خفض الاصابة بأنواع الفطر *Sclerotinia* بنسبة تصل الى اكثر من % 65 و خاصة في حقول نبات دوار الشمس (Steadman، 1979) .

أكد Willetts و Wong، (1980) أنّ الانواع العائدة للفطر *Aspergillus* و *Penicillium* تعد من اهم العوامل الاحيائية التي تتمكن من تدمير الاجسام الحجرية تحت الظروف المختبرية ، إذ اشارت الدراسات الى فعالية انزيم β-1,3 glucanase الذي يفرز بوساطة هذه الانواع في تحطيم و تحليل الجسم الحجري . كما اظهرت الانواع العائدة للفطر *Aspergillus* و الفطر *Penicillium* و المعزولة من الاجسام الحجرية المتفسخة قابلية تضادية اتجاه الفطر *S. sclerotiorum* (Rai و Saxena، ١٩٧٥) .

الجدول (٣) الفطريات المرافقة للأجسام الحجرية و نسبة ظهورها خلال مدد حضن مختلفة .

الفطريات المرافقة	نسبة الظهور %		
	٤٨ ساعة	٧٢ ساعة	٩٦ ساعة
A. niger	٢٥	٢٥	٢٥
A. terreus	٢٥	٢٥	٢٥
Penicillium sp.	٠	٠	٥

4 – 3. تأثير الرواشح الخام للفطريات المعزولة من الأجسام الحجرية و راشح الفطر *T. harzianum* على النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum*

أظهرت النتائج في الجدول (٤) ان هناك فروقات معنوية و عند مستوى احتمالية 0.05 لنوع راشح الفطر و تركيز الراشح ، و ان هناك فروقات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 نتيجة التداخل بين العاملان في أعلاه ، و أنه كلما زاد تركيز الرواشح الخام للفطريات كلما زاد التأثير التثبيطي على نمو الفطر الممرض .

فمن حيث تركيز الراشح الفطري اظهر التركيز% ٦٠ كما في الشكل (٣) تفوقا على التراكيز 15 ، 30 و 45% في تأثيره التثبيطي على نمو الفطر *S. sclerotiorum* و بفروقات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 ، إذ أعطى معدل نمو للفطر 1.7 سم و بنسبة تثبيطية % ١٠٠مقارنة ببقية التراكيز ٤٥ و ٣٠ و % ١٥ التي أعطت معدل نمو قطري ٢,٤٥ ، ٣,٩٥ و ٥,٣ سم على التوالي و بنسب تثبيطية مقدارها ١٠٠ ، ٦٧ و % ٦٢,٦ ، أما معاملة السيطرة فأعطت معدل نمو قطري للفطر بلغ ٨,٥ سم . أما فيما يخص نوع الراشح الفطري أظهر *T. harzianum* تفوقا على بقية الرواشح في تأثيره التثبيطي على نمو الفطر *S. sclerotiorum* ، فأعطى أقل معدل نمو للفطر و هو 3.26 سم و بنسبة تثبيط % ١٠٠ ، إذ بلغ معدل نمو مستعمرة الفطر 0 سم عند التركيزين 45% و 60% ، في حين التركيزين 15% و

30% أعطيا معدل نمو للفطر 5 و 2.8 على التوالي ، و يأتي راشح الفطر *Penicillium sp.* بالمرتبة الثانية بين رواشح الفطريات في تأثيره التثبيطي ، إذ أعطى معدل نمو 3.28 سم و بنسبة تثبيط ١٠٠% ، فقد بلغ معدل نمو مستعمرة الفطر 0 سم عند تركيز % 60 ، في حين ان التراكيز 15 ، 30 و 45% أعطت معدل نمو للفطر 3.2 ، 3.1 و 1.6 سم على التوالي ، أما راشح الفطر *A. terreus* فقد جاء بالمرتبة الثالثة الذي أعطى معدل نمو 5.22 سم و بنسبة تثبيط % ٦٠ ، إذ بلغ معدل نمو الفطر 3.4 سم عند تركيز 60% ، في حين ان التراكيز 15 ، 30 و 45% أعطت معدل نمو للفطر 6.3 ، 4.5 و 3.4 سم على التوالي ، و جاء راشح الفطر *A. niger* بالمرتبة الاخيرة إذ أعطى معدل نمو 5.78 سم و بنسبة تثبيط % ٥٨,٨ ، إذ بلغ معدل نمو الفطر 3.5 سم عند التركيز 60% ، في حين أعطت التراكيز 15 ، 30 و 45% أعطت معدل نمو 6.7 ، 5.4 و 4.8 سم على التوالي .

تتفق نتائج تأثير راشح الفطر *T. harzianum* مع Castillo و آخرون، (2011) الذي وجد بأن المواد الأيضية للفطر *Trichoderma* المنتجة في الوسط الغذائي السائل قد ثبطت النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum* بنسبة 100% ، كما اشار الى ان الفطر *T. harzianum* ينتج Furanone و Trichorziamines و هما من المواد الأيضية الثانوية و التي لها تأثير المضاد الحيوي من خلال تغيير التركيب الوراثي للغزل الفطري للفطر *S. rolfsii* ، و ذكر ايضا بأن الانواع المختلفة للفطر *Trichoderma* و السلالات المختلفة و العائدة لنفس النوع غالبا ما تنتج مركبات تمتلك فروقا معنوية و هذا يدل على ان كل نوع فطري يعبر عن اختلافه عن بقية الانواع و العائدة لنفس الفطر *Trichoderma* من خلال النواتج الأيضية الثانوية ، و ذكر Howell، (2003) بأن انتاج أنواع الفطر *Trichoderma* للأنزيمات هي أحدى وسائله في المكافحة الإحيائية ، فالأنزيمات مثل Chitinases و Glucanases تعمل على ايقاف تقدم الممرضات النباتية الفطرية من خلال تحطيم Polysaccharides ، Chitin و β-glucans وهي المسئولة عن صلابة الجدران الخلوية للفطريات .

أما فيما يخص نتيجة تأثير راشح الفطر *Penicillium sp.* فهي تعود الى انتاج المضادات الحيوية و هي احدى اليات الفطر المهمة في المكافحة الاحيائية ، إذ يحتوي الراشح على عدد من المواد الأيضية مثل Griseofulvin و Penitrem (Ali و آخرون، 2011) ، و قد وجد بأن رواشح بعض انواع الفطر *Penicillium* لها كفاءة تثبيطية عالية ضد الفطر *Botrytis cinerea* و هو من الفطريات قريبة الصلة الوراثية بالفطر *S. sclerotiorum* كما يشترك معه في المدى الواسع من الانتشار و مقاومته للظروف البيئية غير الملائمة

(Santamarina و آخرون، 2002 ؛ Amselem و آخرون، 2011) ، كما وجد ايضا بأن راشح الفطر *P. restrictum* يحتوي على مضادات فطرية مثل Dehydrocarolic Acid اضافة الى Gliotoxin و هو سم فطري لا يمتلك خواص المضادات الحيوية حيث يمتلك الدور الاهم في التضاد مع الفطريات ، كذلك تنتج بعض انواع الفطر *Penicillium* مواد ايضية ثانوية مثل Dihydrocurvularin ، Restricticin ، Triene و Pyran إذ تتميز هذه المواد بفاعليتها الواسعة ضد مدى كبير من الخمائر و الفطريات الخيطية (Nicoletti و Stefano، 2012) .

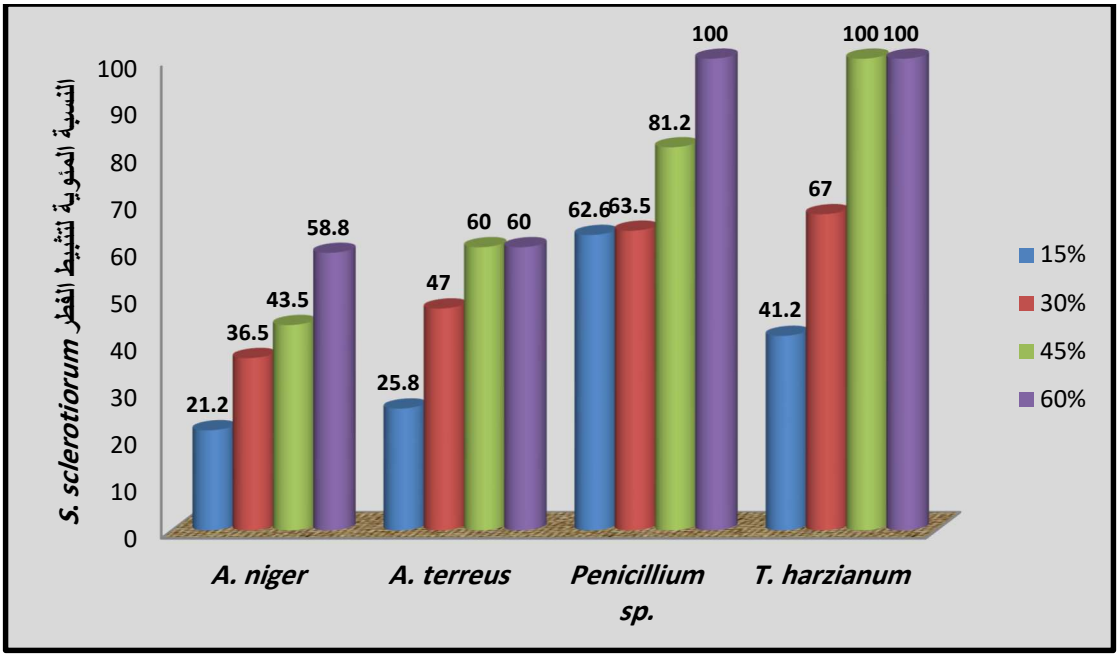
أظهرت نتائج راشح الفطر *A. terreus* وجود تأثير تثبيطي معتدل على نمو الفطر *S. sclerotiorum* ، و هذه النتيجة لا تتفق لما توصل اليه Melo و آخرون، (2006) إذ اكد ان الفطر *A. terreus* يعمل على تثبيط نمو الغزل الفطري للفطر *S. sclerotiorum* و ايضا تثبيط انبات الاجسام الحجرية بنسبة 100% . ينتج الفطر *A. terreus* العديد من المواد الأيضية الثانوية التي يعزى اليها الكفاءة التثبيطية و تشمل Aspulvinone ، Asterric Acid ، Asterrriquinone ، Butyrolactone I ، Citrinin ، Emodin ، Geodin ، Itaconate ، Lovastatin ، Questrin و Terrecyclic Acid (Awaad و آخرون، 2012) .

يتضح من الجدول (٤) ان راشح الفطر *A. niger* قد جاء في المرتبة الاخيرة في تأثيره التثبيطي بين الانواع الفطرية المستخدمة في الدراسة ، و هذه النتيجة مقاربة للدراسة التي قام بها Reshu و Khan، (2012) فيما يخص تأثير راشح الفطر إذ سجل اقل تأثيرا تثبيطيا ضد الفطر *A. brassicae* و *A. brassicicola* مقارنة مع بعض انواع الفطر *Trichoderma* و قد يعود السبب في اختلاف التأثير التثبيطي للفطر *A. niger* الى اختلاف العزلة . اكد Zareen و آخرون، (2001) امكانية الفطر *A. niger* في انتاج السموم الفطرية و ايضا حامض الأوكزاليك في الوسط الغذائي السائل و هي تعد من المضادات في مكافحة الاحياء الدقيقة المتطفلة على النباتات ، كما لاحظ Narayana و آخرون، (2007) قابلية الفطر *A. niger* في اختزال حجم النواة بنسبة 11% في خلايا الاحياء التي يتطفل عليها .

الجدول (٤) تأثير نوع و تركيز رواشح بعض الفطريات في النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum* (سم) بعد سبعة أيام من الحضانة .

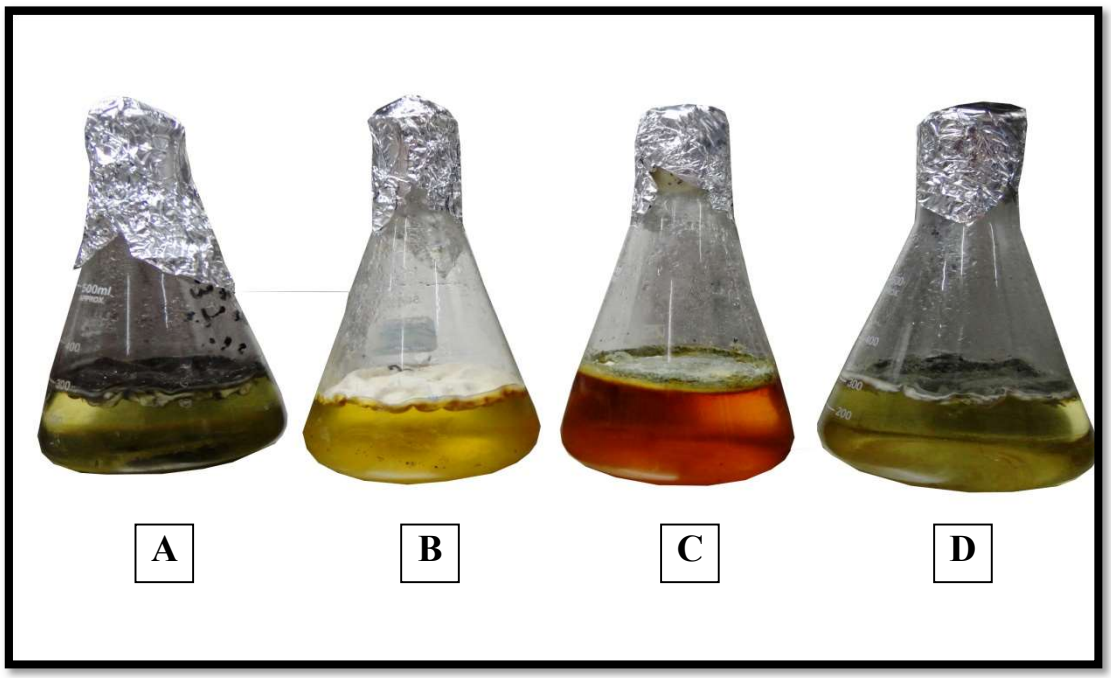
التركيز / النوع الفطري	السيطرة	15%	30%	45%	60%	معدل تأثير النوع الفطري
A . niger	8.5	6.7	5.4	4.8	3.5	5.78
A . terreus	8.5	6.3	4.5	3.4	3.4	5.22
Penicillium sp.	8.5	3.2	3.1	1.6	0.0	3.28
T. harzianum	8.5	5.0	2.8	0.0	0.0	3.26
معدل تأثير التركيز	8.5	5.3	3.95	2.45	1.7	

العامل	النوع الفطري	التركيز	التداخل
L.S.D. 0.05	0.40	0.45	0.89



الشكل (٣) تأثير تراكيز الرواشح الفطرية في النسبة المئوية لتثبيط الفطر *S. sclerotiorum*

.



الشكل (٤) الفطريات النامية على وسط PDB بدرجة حرارة 25 ± 2 °م و لمدة 14 يوم .

***T. harzianum* : C** ***A. niger* : A**

***Penicillium sp.* : D** ***A. terreus* : B**

4 – 4. مقدار التحرك النسبي R_f للمكونات المفصولة بتقانة صفائح كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC)

بينت نتائج فصل المستخلصات الفطرية باستعمال تقانة صفائح كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) وبعد فحص الصفائح تحت الاشعة فوق البنفسجية بطول موجي 365 نانوميتر أنّ الرواشح الفطرية قد تباينت في عدد البقع وقيم التحرك النسبي R_f و كما هو واضح في الجدول (٥) ، إذ سجل الفطر *T. harzianum* أعلى عدد للبقع هو 23 بقعة كما في الشكل (٨) ، و جاء بعده الفطر *A. terreus* اذ احتوى على 21 بقعة كما في الشكل (٦) ، ثم الفطر *A. niger* 20 بقعة كما في الشكل (٥) ، و اخيرا سجل الفطر *Penicillium sp.* اقل عدداً من البقع هو 16 بقعة كما في الشكل (٧) .

اما فيما يخص قيم التحرك النسبي R_f فقد ظهرت اعلى قيمة عند الفطر *A. terreus* و هي 0.91 ، و ادنى قيمة عند الفطرين *Penicillium sp.* و *T. harzianum* و هي 0.06 ، و مما تجدر الاشارة اليه ان المستخلصات قد تشابهت مع بعضها في عدد من قيم التحرك النسبي R_f ، اذ اشترك الفطر *Penicillium sp.* مع الفطر *T. harzianum* في القيم 0.06 ، 0.30 ، 0.32 ، و اشترك الفطر *A. niger* مع الفطر *Penicillium sp.* في القيم 0.11 ، 0.13 ، 0.39 ، و ايضا اشترك الفطر *A. niger* مع الفطر *A. terreus* في القيم 0.19 ، 0.25 ، 0.34 ، اما الفطر *A. terreus* فقد اشترك مع الفطر *T. harzianum* في القيم 0.48 ، 0.55 ، 0.58 ، 0.86 . كما اشتركت الفطريات *A. niger* ، *Penicillium sp.* و *T. harzianum* في القيم 0.17 ، 0.18 ، 0.26 ، 0.33 ، 0.42 ، و كذلك اشتركت الفطريات *A. terreus* ، *Penicillium sp.* و *T. harzianum* في قيمة واحدة هي 0.29 .

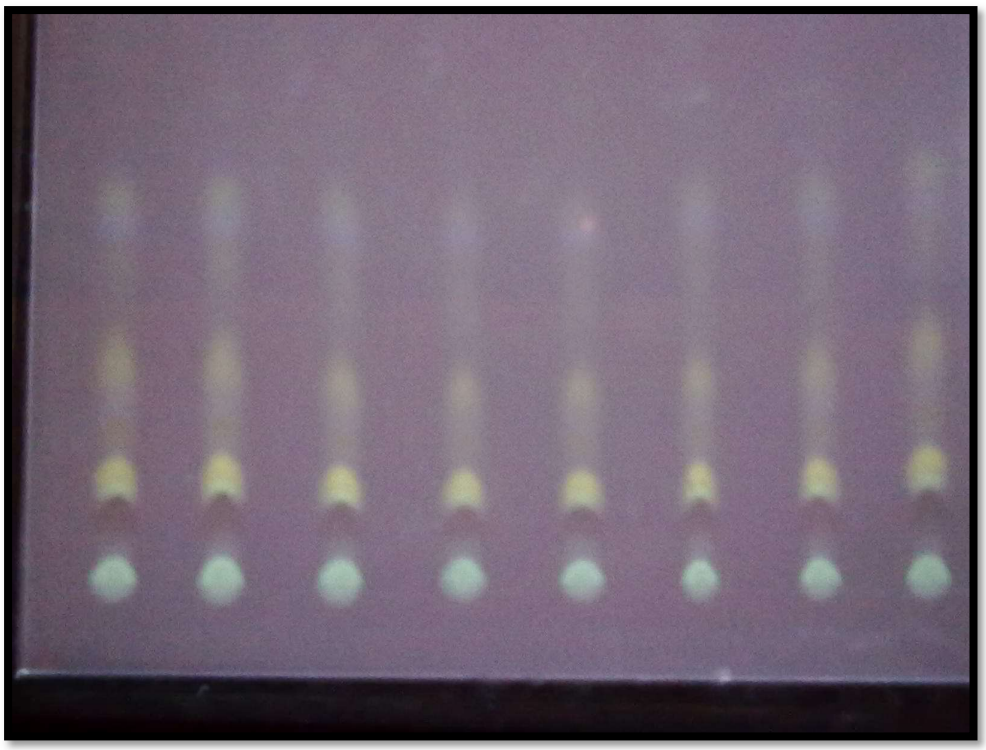
تمكن Padmini و Praveena ، (٢٠١١) من الحصول على قيمة R_f من راشح الفطر *A. niger* تطابق قيمة R_f القياسية للسم الفطري Malformin و هي ٠,٥٤ و باستخدام تقانة TLC . بين Ling و اخرون ، (١٩٨٢) وجود سموم فطرية من نوع Territrem A (TRA) و Territrem B (TRB) تم عزلها من راشح الفطر *A. terreus* النامي على وسط الرز و بأستخدام تقانة TLC ، إذ وجدت قيم R_f مختلفة بسبب اختلاف المذيب ، فقد سجلت قيمة R_f ٠,١٠ للسم TRA و ٠,٠٧ للسم TRB عند استخدام Chloroform كمذيب بينما سجلت القيم ٠ ، ٠,٦٦ ، ٠,٨٨ ، ٠,٩٠ للسم TRA و القيم ٠ ، ٠,٤٣ ، ٠,٨١ ، ٠,٨٩ للسم TRB

عند استخدام المذيبات Benzene ، Diethyl Ether ، Ethyl Acetate ، Acetone على التوالي ، كما اختلفت قيم R_f ايضاً عند استخدام انظمة فصل مختلفة إذ بلغت ٠,٣٣ للسم TRA و ٠,٢٣ للسم TRB عند استخدام نظام الفصل (7:3) (Benzene : Ethyl Acetate) في حين بلغت قيمة R_f ٠,٣٧ للسم TRA و ٠,٣٠ للسم TRB عند استخدام نظام الفصل (Chloroform : Acetone) (٩٣:٧) . أوضح Anstis ، (٢٠٠٤) بأن الفطر *P. radicum* النامي على وسط خلاصة الشعير السائل يمتلك القابلية على انتاج الأوكسين Auxin و منها Indol Acetic Acid (IAA) من خلال تطابق قيم R_f و التي بلغت ٠,٦ بعد استخلاص الراشح بوساطة الميثانول و استخدام نظام الفصل (Chloroform : Ethanol) (80 : 20) .

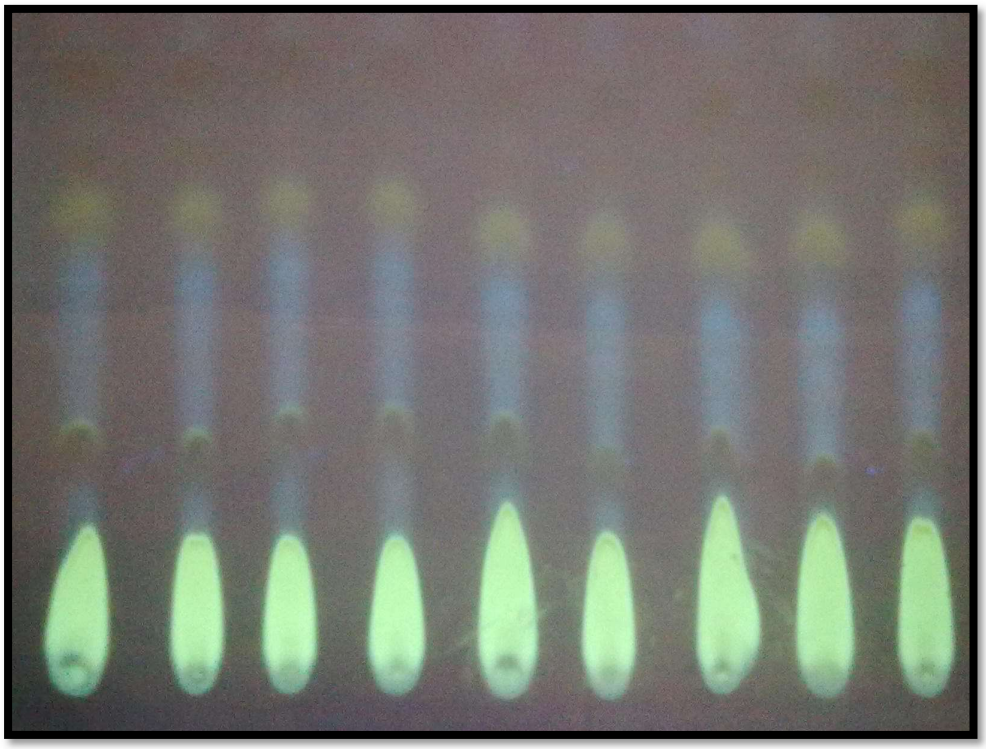
يمتلك راشح الفطر *T. harzianum* المستخلص بوساطة الميثانول و بأستخدام نظام الفصل (Chloroform : Methanol) (٧٠:٣٠) فاعلية تثبيطية كاملة عند قيمة R_f ٠,٥٣ ضد الفطريات *S. rolfsii* ، *R. solani* ، *F. oxysporum* في حين لم تسجل قيمة R_f ٠,١٧ و ٠,٨٢ تثبيط كامل ضد الفطريات الثلاثة السابقة (Choudary و آخرون ، ٢٠٠٧) ، يعود السبب في قابلية التثبيط العالية لراشح الفطر *T. harzianum* الى وجود مركبات مثل Butenolide و Azaphilone (Vinale و اخرون ، ٢٠٠٦) .

الجدول (٥) عدد البقع و قيم التحرك النسبي R_f للمستخلصات الفطرية .

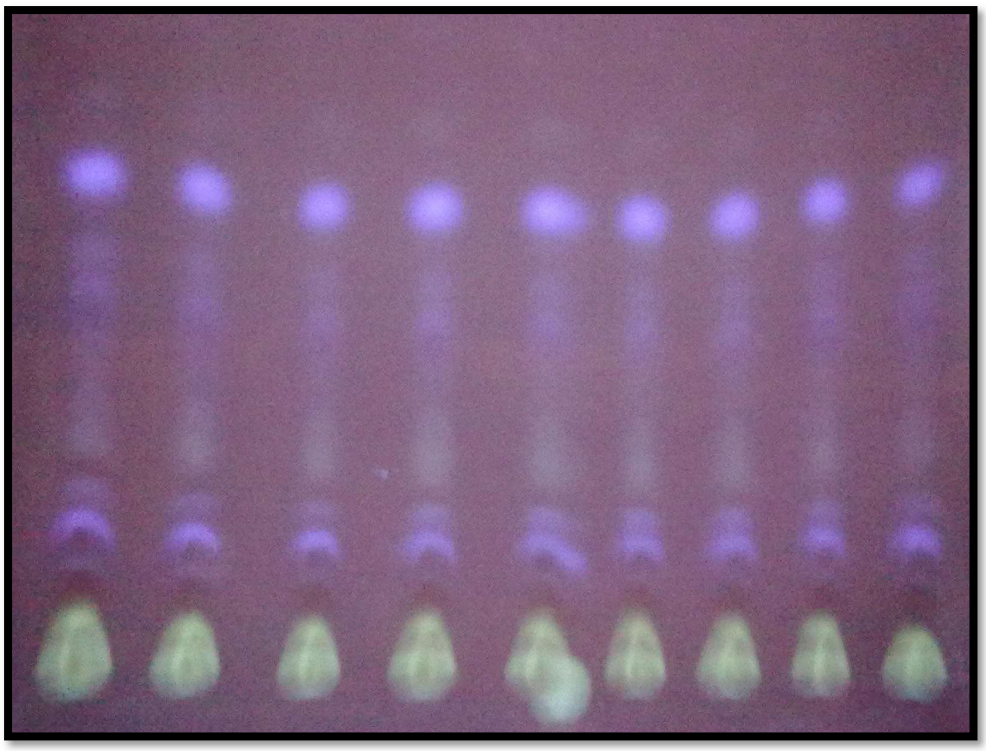
عينة المستخلص	عدد البقع	قيم R_f					
A . niger	20	0.11	0.13	0.17	0.18	0.19	0.20
		0.23	0.24	0.25	0.26	0.27	0.28
		0.33	0.34	0.35	0.36	0.39	0.40
		0.41	0.42				
A . terreus	21	0.15	0.16	0.17	0.18	0.19	0.29
		0.47	0.48	0.49	0.50	0.51	0.54
		0.55	0.56	0.57	0.58	0.86	0.88
		0.89	0.90	0.91			
Penicillium sp.	16	0.06	0.10	0.11	0.13	0.14	0.15
		0.17	0.18	0.26	0.29	0.30	0.31
		0.32	0.33	0.39	0.42		
T . harzianum	23	0.06	0.16	0.25	0.26	0.29	0.30
		0.32	0.33	0.34	0.38	0.42	0.48
		0.55	0.58	0.66	0.71	0.73	0.74
		0.76	0.81	0.82	0.85	0.86	



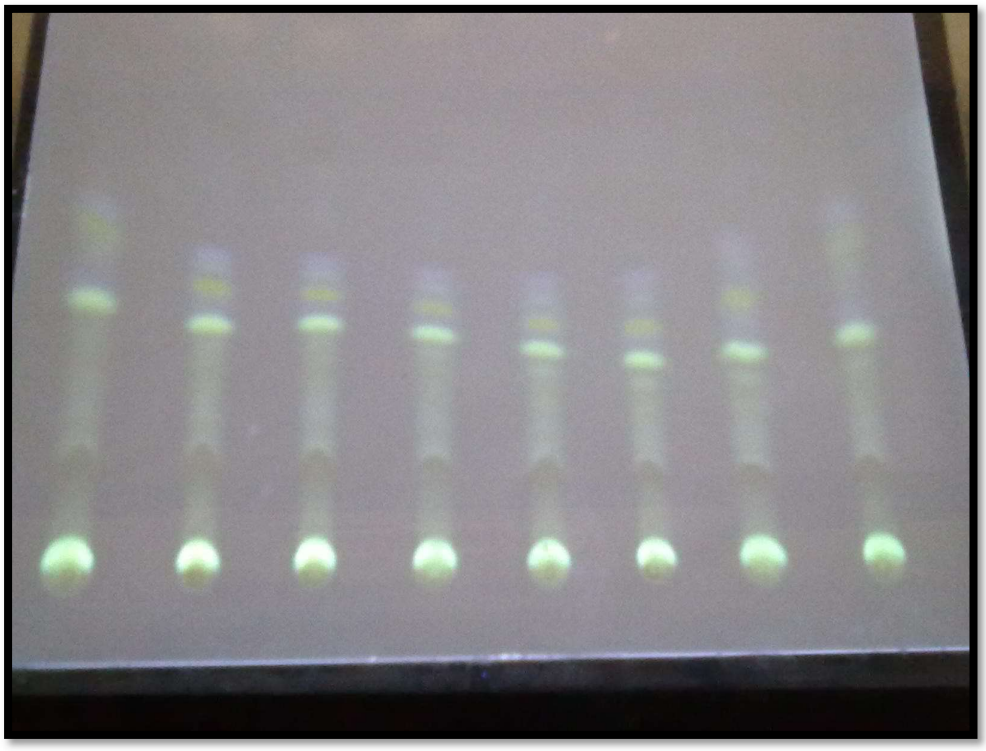
الشكل (٥) عينة راشح الفطر *A. niger* المفصولة باستخدام تقنية TLC .



الشكل (٦) عينة راشح الفطر *A. terreus* المفصولة باستخدام تقنية TLC .



الشكل (٧)عينة راشح الفطر *Penicillium sp.* المفصولة باستخدام تقنية TLC .



الشكل (٨) عينة راشح الفطر *T. harzianum* المفصولة باستخدام تقنية TLC .

4 – ٥. المجاميع الفعالة للرواشح الفطرية

في ضوء نتائج الدراسة الحالية عن الفعالية التثبيطية للمستخلصات الفطرية باستخدام الكلوروفورم للفطريات المشمولة بالدراسة فقد جرى التحري عن محتواها من المركبات الفعالة باستعمال بعض الكواشف الكيميائية المختلفة ، اذ اظهرت الكشوفات الكيميائية ان الفطريات المدروسة تحتوي عددا من المكونات الفعالة و ايضا اشتركت جميعها في عدم احتوائها على الفينولات كما في الجدول (6) ، إذ احتوى مستخلص الفطر *A. niger* على القلويدات و التانينات و الفلافونيدات و الكاربوهيدرات بينما لم يحتوي على الصابونينات و الكلايكوسيدات ، اما مستخلص الفطر *A. terreus* فقد احتوى على جميع المكونات الفعالة ، في حين ان مستخلص الفطر *Penicillium sp.* احتوى على القلويدات و التانينات و الصابونينات و الكلايكوسيدات و الكاربوهيدرات و لم يحتوي على الفلافونيدات ، و احتوى مستخلص الفطر *T. harzianum* على القلويدات و التانينات و الكلايكوسيدات و الكاربوهيدرات مع عدم وجود الصابونينات و الفلافونيدات .

أكدّ Vinokurova و آخرون ، (٢٠٠٣) وجود القلويدات في رواشح ١٠٢ عزلة من الفطر *Aspergillus* بضمنها النوع *niger* ، أذ تم استخدام تقانة TLC لفصل القلويدات من بقية النواتج الأيضية الثانوية ، كما أشار Chen و آخرون ، (٢٠١٣) الى احتواء راشح الفطر *Aspergillus sp.* على القلويدات إضافة الى مركبين جديدين من Phenyl Ether . ذكر Zhang و اخرون ، (٢٠٠٥) احتواء الفطر *A. terreus* النامي في وسط PDA على القلويدات . اوضح Vinokurova و آخرون ، (٢٠٠٤) الى ان راشح الفطر *Penicillium aurantiogriseum* و النامي على وسط ABE المكون من Mannitol و Succinic Acid و $MgSO_4 . 7H_2O$ و KH_2PO_4 يحتوي على ثلاث انواع من القلويدات هي Anacine و Aurantine و Aurantiamine . و فيما يخص الصابونينات فأن النتيجة تتفق مع ما ذكره Yuan و اخرون ، (٢٠١٢) في وجود الكلايكوسيدات من نوع Peniciside في راشح الفطر *Penicillium sp.* اما وجود الفلافونيدات في الفطر *A. niger* فهذه النتيجة تتفق مع Mahmoud و اخرون ، (٢٠٠٨) كما اختبر الفعالية الاحيائية للفلافونيدات ضد بعض الاحياء المجهرية مثل *A. flavus* .

بينت الدراسة التي قام بها Holligan و Lewis ، (١٩٧٣) الى وجود الكاربوهيدرات بشكل مانيتول و ارابيتول بكميات كبيرة في راشح الفطر *A. clavatus* في حين احتوى ايضاً

على كميات قليلة من الكلوكوز و مايواينوسيتول و تريهالوز . اما محتوى راشح الفطر *T. viride* من الكاربوهيدرات فقد كان الأعلى بين المركبات الأخرى اذ بلغ ٦٦,٦ % و ذلك بعد تنميته على وسط نخالة الحنطة السائل (Uma و Aiswarya ، ٢٠١٢) . و فيما يخص الفينولات فقد اشار Andersen ، (١٩٩١) الى تنقية الفينولات من النواتج الأيضية للفطر *P. brevicompactum* باستخدام تقانة High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .

الجدول (6) نتائج الكشوفات النوعية للمستخلصات الفطرية

الكشوفات النوعية	*A . Niger*	*A . terreus*	*Penicillium sp.*	*T. harzianum*
الكشف عن القلويدات **● كاشف ماير**	+	+	+	+
الكشف عن التانينات **● كشف خلات الرصاص**	+	+	+	+
الكشف عن الصابونينات **● كشف الرغوة الكثيفة**	-	+	+	-
الكشف عن الكلايكوسيدات **● كاشف موليش**	-	+	+	+
الكشف عن الفلافونيدات **● كشف حامض الكبريتيك المركز**	+	+	-	-
الكشف عن الكاربوهيدرات **● كشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز**	+	+	+	+
الكشف عن الفينولات **● كشف كلوريد الحديديك**	-	-	-	-

4 – ٦. تأثير المستخلصات في نمو الفطر *S. sclerotiorum*

بعد التأكد من احتواء مستخلصات الرواشح الخام للفطريات على بعض المركبات الكيميائية من خلال استخدام تقانة صفائح TLC و اجراء الكشف النوعي الكيميائي ، تم اختبار التأثير التثبيطي لتلك المستخلصات في نمو الفطر *S. sclerotiorum* باستخدام طريقة انتشار القرصDisc Diffusion Method .

أظهرت النتائج في الجدول (7) ان هناك فروقات معنوية و عند مستوى احتمالية 0.05 بين مستخلص الفطر *A. terreus* الذي اعطى اعلى معدل للتثبيط 1.375 ملم و الفطر *Penicillium sp.* إذ أعطى معدل تثبيط 0.375 ملم ، كذلك كانت الفروقات معنوية بين الفطر *A. niger* و الفطر *A. terreus* و بينما لم تكن الفروقات معنوية بين الفطر *Penicillium sp.* و الفطر *T. harzianum* ، كما أظهرت نتائج التحليل الإحصائي بأنه توجد فروقات معنوية بين مستخلص الفطر *A. terreus* و معاملة السيطرة .

و كما هو واضح في الجدول (7) ان الفطر *A. terreus* جاء بالمرتبة الاولى في كفاءة التثبيط ، إذ يعد من الفطريات المنتجة للمواد الايضية الثانوية بكثرة (Awaad و آخرون، 2012) ، فقد اشار Calvo و آخرون، (2002) الى انتاج Butyrolactone I و هي مادة مثبطة للأحياء حقيقية النواة التي تمتلك الانزيم Cyclin-Dependent Kinases ، كما تمكن Choudhary و أخرون، (2004) من عزل اربعة مركبات تمتلك فعالية تثبيطية ضد بعض الفطريات الجلدية مثل *Microsporum canis* و *Trichophyton longifusus* ، و ايضا يعود سبب الكفاءة التثبيطية لمستخلص الفطر *A. terreus* الى انتاجه مضاد حيوي مهم و اساسي هو Terrecyclol (Isogai و آخرون، 1984).

لقد أظهر مستخلص الفطر *Penicillium sp.* نتيجة مقاربة لما توصل اليه Thanaboripat و آخرون، (2011) إذ استطاع تثبيط نمو الفطر *A. flavus* باستخدام المستخلص الخام للفطر *Penicillium sp.* بوساطة Hexane و Ethyl Acetate كمذيبات و من خلال تطبيق طريقة انتشار القرص Disc Diffusion Method . و قد يعزى سبب التثبيط لقدرة الفطر *Penicillium sp.* على انتاج مواد ايضية ثانوية تعود الى مركبات Naphthalenoids التي اثبتت فاعلية تثبيطية ضد مجموعة من الاحياء الدقيقة (Takahashiو آخرون، 2009) .

اما فيما يخص نتيجة مستخلص الفطر *A. niger* الذي لم يسجل أي تثبيط فهي لا تتفق مع Fawzy و آخرون، (2011) إذ وجد أن المستخلص الخام للفطر *A. niger* أعطى تثبيطا عاليا ضد بعض الاحياء المجهرية ، كما لا تتفق مع ما ذكره Vaish و Sinha، (2006) بأن جميع عزلات الفطر *A. niger* قد ثبطت نمو الفطر *R. solani* ، اما مستخلص الفطر *T. harzianum* فلم يسجل تثبيط ضد الفطر *S. sclerotiorum* ، هذه النتيجة لا تتفق مع Choudary و آخرون ، (2007) الذي وجد مستخلص الفطر *T. harzianum* له فعالية تثبيطية ضد الفطر *S. rolfsii* ، و ايضا لا تتفق مع الدراسة التي قام بها Chhabra و آخرون، (2004) إذ وجد أنّ المستخلص الخام للفطر *T. harzianum* قد ثبط نمو الفطر *P. notatum* اضافة الى العديد من انواع البكتريا بأستخدام طريقة الانتشار في حفر الاكار Agar Wells Diffusion Method .

و قد يعود السبب في عدم تسجيل تثبيط بواسطة مستخلصي الفطرين *A. niger* و *T. harzianum* الى نوع المذيب الذي تفضله المركبات الفعالة في المستخلصات ، حيث ان وجود مزيج يتكون من المذيب اضافة الى 3-methyl-1-butanol ، Naphthalene و Propanoic Acid ضروري للحفاظ على النشاط المثبط للمستخلصات ضد الفطريات النباتية الممرضة مثل *S. sclerotiorum* ، *Pythium ultimum* و *R. solani* (Fialho و آخرون، 2011). كما ان استخلاص راشح الفطر *A. niger* بواسطة Hexane و Ethyl Acetate يكون اكثر سمية تجاه خلايا الاحياء المجهرية مقارنة مع المذيبات الاخرى (Ali Siddiqui و آخرون، 2001) .

الجدول (7) تأثير المستخلصات الفطرية الخام في تثبيط نمو الفطر *S. sclerotiorum* (ملم) النامي على وسط PDA بعد سبعة ايام من النمو .

المستخلص الفطري	معدل قطر منطقة التثبيط (ملم)
السيطرة	٠
A.niger	٠
A . terreus	1.375
Penicillium sp.	0.375
T. harzianum	٠
$L.S.D_{0.05}$	0.5995

4 – ٧. إختبار الكفاءة التضادية للفطريات المعزولة من الأجسام الحجرية و الفطر *T. harzianum* ضد الفطر *S. sclerotiorum*

بينت نتائج الدراسة الموضحة في الجدول (8) حصول تباين في القدرة التضادية للفطريات *A. niger* ، *A. terreus* ، *Penicillium sp.* و *T. harzianum* ضد الفطر *S. sclerotiorum* ، فقد أظهرت مستعمرات الفطر *A. terreus* النامية في الوسط الغذائي PDA كفاءة تضادية بلغت 1 حسب مقياس (Bell و آخرون، 1982) و هذه النتيجة تتفق مع ما توصل

اليه Melo و آخرون، (2006) إذ وجد الفطر *A. terreus* يعطي درجة عالية من التضاد بواسطة سرعة نموه و تفوقه على الغزل الفطري للفطر *S. sclerotiorum* كما يعمل على تحليل خلايا العائل بسبب انتاجه للعديد من المواد الايضية النوعية . اما فيما يخص الفطر *Penicillium sp.* فقد سجل درجة تضاد بلغت 2 حسب مقياس (Bell و آخرون، 1982) و هذه النتيجة مقاربة للدراسة التي قام بها Dhliwayo (2008) إذ كانت نسبة تثبيط نمو الفطر *S. sclerotiotum* بواسطة الفطر *P. citrinum* اكثر من 60% باستخدام طريقة الزرع المزدوج ، حيث يعد الفطر *P. citrinum* من الفطريات المنتجة للسموم الفطرية التي تثبط نمو الغزل الفطري لأنواع الفطر *Sclerotinia* ، كما ان اضافة 20% من راشح الفطر *P. citrinum* الى وسط نمو الفطر *S. minor* و الفطر *S. rolfsii* يثبط النمو بشكل تام .

سجل الفطر *T. harzianum* درجة تضاد 2 ، و هذه النتيجة قريبة لما توصل اليه De-Oliveira و آخرون، (2010) إذ سجل الفطر *T.viride* و الفطر *T. aureoviride* درجة تضاد بلغت 2 في حين سجل الفطر *T. harzianum* درجة تضاد بلغت1 ضد الفطر *S. sclerotiorum* حسب مقياس (Bell و آخرون، 1982) . تؤثر الظروف البيئية ولاسيما درجة الحرارة و الرقم الهيدروجيني فضلا عن العديد من العوامل الحيوية و غير الحيوية مثل النوع النباتي و نوع التربة و محتواها المايكروبي في القدرة التضادية للفطر *T. harzianum* (Akrami و آخرون، 2011) ، فقد ذكر Kredics و آخرون، (2003) ان الفطر *Trichoderma* ينمو في مدى واسع من الارقام الهيدروجينية ، اما درجة الحرارة المثلى للنمو فإنها تختلف باختلاف نوع الفطر لكن بصورة عامة فأنه ينمو عند الدرجات الحرارية المعتدلة و هذا يقلل من قابلية الفطر على حماية النبات من الاصابة بالسلالات الفطرية الممرضة المقاومة للدرجات الحرارية المنخفضة خلال فصل الشتاء البارد او الربيع ، لكن الظروف البيئية المثلى للتضاد هي درجة حرارة 25 ^{o}م و رقم هيدروجيني يتراوح بين 6 - 8 . ان ابرز اليات التضاد التي يستخدمها الفطر *Trichoderma* للقضاء على الفطريات الممرضة هي التنافس Competition و ذلك من خلال نموه السريع الناتج من سرعة استهلاكه للمواد المغذية الموجودة في الوسط ، و التطفل الذي يحدث من خلال التفاف فطر التضاد على الغزل الفطري للمضيف و انبات الأبواغ عليه و احداث تشوهات في جدرانه و تحلل خلاياه من خلال افرازه للعديد من الانزيمات المحللة مثل Chitinase و Cellulose و المضادات الحيوية ، كما يظهر الغزل الفطري للفطر *Trichoderma* بأشكال مختلفة عند تطفله كالخيوط اللولبية او بشكل ممصات تخترق جدار العائل او خطاطيف او اعضاء التصاق (Papavizas، 1985) .

اما الفطر *A. niger* فقد سجل ادنى درجة للتضاد بلغت 3 مع عدم اختزاله لإنتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* ، حيث سمح للفطر بإنتاج جسم حجري واحد وصل حجمه الى 0.2 سم ، و هذه النتيجة لا تتفق مع Dhliwayo، (2009)الذي اكد بأن الفطر *A. niger* كان الاكثر كفاءة من بين كل الفطريات المعزولة من تربة الحقل المصابة بالفطر *S. sclerotiorum* بنسبة وصلت الى اكثر من 70% كما لم يسجل أي وجود للأجسام الحجرية في اطباق التضاد التي احتوت على الفطر *A. niger* .

الجدول (8) الكفاءة التضادية للفطريات المعزولة من الأجسام الحجرية و الفطر *T. harzianum* ضد الفطر *S. sclerotiorum* في الوسط الغذائي PDA .

نوع الفطر	درجة التضاد
A . niger	**3**
A . terreus	**1**
Penicillium sp.	**2**
T . harzianum	**2**

4 – ٨. تأثير بعض العوامل البيئية في معدل النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum* و أنتاج حامض الأوكزاليك

4 – ٨ – 1. تأثير نوع الوسط الغذائي في النمو القطري للفطر .

أشارت نتائج تجربة تأثير نوع الوسط الغذائي في معدل نمو الفطر *S. sclerotiorum* كما في الجدول (9) الى وجود فروقات معنوية و عند مستوى احتمالية 0.05 بين معدلات نمو الفطر في الوسط الغذائي PDA ، CDA ، OA و SDA و مدة الحضن طوال فترة التجربة و ان هناك فروقات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 نتيجة التداخل بين العاملان في اعلاه ، إذ أوضحت نتائج الدراسة ان اعلى مستوى لنمو الفطر كان في وسط CDA فقد أعطى اعلى معدل نمو 6.63 سم إذ بلغ قطر مستعمرة الفطر 8.5 سم في اليوم السابع من الحضن تلاه وسط PDA الذي أعطى معدل نمو هو 5.35 سم و بلغ قطر المستعمرة 8.5 سم ثم وسط OA أعطى معدل نمو 4.17 سم و بلغ قطر المستعمرة 5.25 سم و اخيرا وسط SDA الذي اعطى أدنى معدل للنمو هو 1.9 سم إذ بلغ قطر المستعمرة 2.25 سم .

و بينت نتائج التجربة نفسها ازدياد معدلات نمو الفطر *S. sclerotiorum* بصورة كبيرة مع زيادة مدة الحضن ، إذ بلغ معدل النمو القطري ٦,٦٣ سم و بعد ٧ يوم من الحضن مقارنة بـ ٢,٩ سم بعد ٥ يوم من الحضن غطى الفطر مساحة الطبق بالكامل في اليوم السابع بالنسبة لوسط PDA و CDA ، ثم تباطأت معدلات النمو عند وسط OA إذ سجل معدل نمو 5.5 سم تلاه وسط SDA إذ لم يتجاوز قطر المستعمرة الفطرية 2.25 سم في نهاية مدة الحضن.

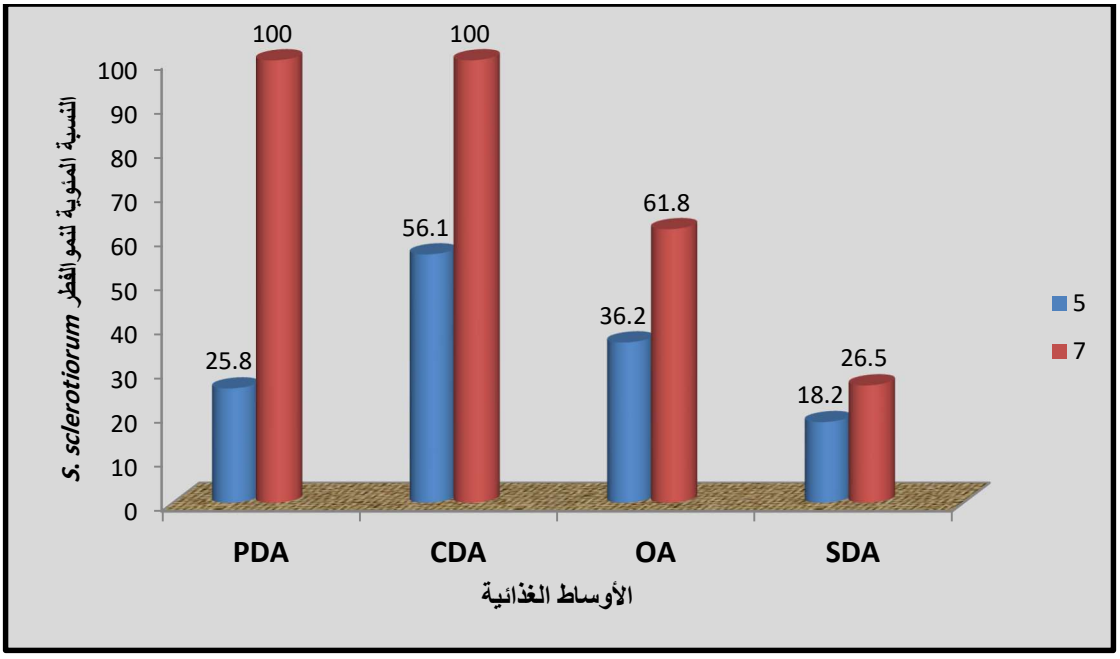
و من التداخل في الجدول (9) بين العامل (نوع الوسط) و العامل (مدة الحضن) يتضح أن أعلى معدل للنمو القطري (8.5 سم) كان في معاملة التداخل (اليوم السابع + وسط PDA أو CDA) ، مقارنة بأدنى معدل للنمو القطري (١,٥٥سم) في معاملة التداخل (اليوم الخامس + وسط SDA) . يوضح الشكل (٩) بأن أعلى نسبة مئوية لنمو الفطر *S. sclerotiorum* كانت في وسط PDA و CDA إذ بلغت ١٠٠٪ ثم وسط OA الذي سجل ٦١,٨٪ و وسط SDA بنسبة ٢٦,٥ % بعد ٧ يوم من الحضن ، في حين بلغت أعلى نسبة نمو بعد ٥ يوم من الحضن في وسط CDA إذ بلغت ٥٦,١٪ تلاه وسط OA بنسبة ٣٦,٢٪ ثم وسط PDA بنسبة ٢٥,٨٪ و أخيرا وسط SDA الذي سجل أدنى نسبة نمو للفطر و التي بلغت ١٨,٢٪ .

تباين تأثير نوع الوسط الغذائي في نمو الفطر *S. sclerotiorum* ، و عادة تستمر الزيادة في معدل النمو مع إزدياد مدة الحضانة عند توافر المواد الغذائية في الوسط المستخدم حتى نفاذ المواد الغذائية الضرورية للنمو . حيث لوحظ أن أفضل وسط لنمو الفطر كان في وسط CDA يليه وسط PDA ثم تباطأت معدلات النمو في وسط OA و وسط SDA ، قد يعود سبب النمو السريع للفطر الى توافر المتطلبات الغذائية في هذا الوسط و المتمثلة بنترات الصوديوم كمصدر نتروجيني و السكروز كمصدر كاربوني و فوسفات البوتاسيوم الثنائية كمصدر للفسفور (Khanzada و أخرون، 2003 ؛ Farooq و أخرون، 2005) ، كما أوضح Tariq و أخرون، (1993) و Hussain و آخرون، (2003) أنّ افضل نمو للفطر *B. glaiolorum* و *S. rolfsii* كان في وسط CDA الحاوي على نترات البوتاسيوم كمصدر نتروجيني و الكلوكوز كمصدر كاربوني ، و قد اشار السعد، (1990) الى ان المصدر الكاربوني الموجود في الوسط الغذائي يؤثر في معدل نمو الاحياء المجهرية الذي يتناسب طرديا مع التركيز المتوافر ضمن مستويات معينة . و قد جاءت هذه النتائج مقاربة لما ذكر Agnihotri و Rai، (1971) بأن وسط CDA هو احد الاوساط الجيدة لنمو الفطر *S. sclerotiorum* و في تحفيز الفطر على انتاج الاجسام الحجرية .

الجدول (9) تأثير نوع الوسط الغذائي و مدة الحضن في معدل النمو القطري لفطر *S. sclerotiorum* (سم) بدرجة حرارة 20 ± 2 °م.

نوع الوسط الغذائي	مدة الحضن (يوم)		معدل تاثير نوع الوسط الغذائي
	5	7	
Potato Dextrose Agar (PDA)	2.2	8.5	5.35
Czapek Dox Agar (CDA)	4.77	8.5	6.63
Oat Agar (OA)	3.08	5.25	4.17
Sabrouaud Dextrose Agar (SDA)	1.55	2.25	1.9
معدل تأثير مدة الحضن	2.9	6.13	

العامل	نوع الوسط الغذائي	مدة الحضن	التداخل
$L.S.D_{0.05}$	0.680	0.481	0.962



الشكل (٩) تأثير نوع الوسط الغذائي و مدة الحضن في النسبة المئوية لنمو الفطر *S. sclerotiorum* بعد ٥ و ٧ يوم من الحضن.

4 – ٨ – 2. تأثير نوع الوسط الغذائي في النسبة المئوية لإنتاج حامض الأوكزاليك

بينت نتائج التجربة في الجدول (10) وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 بين انواع الوسط الغذائي . اذ وصلت اعلى نسبة لحامض الاوكزاليك في الوسط SDA بعد سبعة ايام من الحضن بدرجة حرارة 20 ± 2 °م و رقم هيدروجيني 7 الى 69.25% ، تلاه وسط CDA بنسبة 63.25% ، ثم انخفضت نسبة انتاج الحامض في الوسط PDA حيث و صلت النسبة الى 34.5% و كذلك انخفضت في الوسط OA و كانت النسبة 34.75% ، كما لم تسجل أي فروق معنوية بين الوسطين PDA و OA في النسبة المئوية لإنتاج حامض الاوكزاليك .

ان سبب ارتفاع نسبة انتاج الحامض في وسط SDA يعود الى وجود الدكستروز Dextrose كمصدر كاربوني و الببتون Peptone كمصدر نتروجيني و هذه النتيجة تتفق مع Mwangi و أخرون، (2012) بأن وسط Sabouraud Dextrose Agar (SDA) هو الأفضل في انتاج مستويات عالية من حامض الأوكزاليك او الأوكزالات بواسطة الفطر *S. sclerotiorum* ، كما اشار الى ان الوسط الذي يسجل افضل مستوى من تراكم حامض

الأوكزاليك او الاوكزالات ليس هو الوسط الذي يسجل افضل نمو لمستعمرة الفطر *S. sclerotiorum* ، و قد اكد Beaulieu، (2008) على ان انتاج حامض الاوكزاليك بمستويات مرتفعة لا يرتبط بنمو الغزل الفطري .

الجدول (10) تاثير نوع الوسط الغذائي في النسبة المئوية لإنتاج حامض الاوكزاليك Oxalic Acid من الفطر *S. sclerotiorum* .

نوع الوسط الغذائي	النسبة المئوية لحامض الأوكزاليك
Potato Dextrose Agar (PDA)	**34.5**
Czapek Dox Agar (CDA)	**63.25**
Oat Agar (OA)	**34.75**
Sabrouaud Dextrose Agar (SDA)	**69.25**
$L.S.D_{0.05}$	**0.276**

4 – ٨ – 3. تأثير الرقم الهيدروجيني في النمو القطري للفطر

أظهرت النتائج في الجدول (11) بأن الرقم الهيدروجيني ٥,٥ للوسط الغذائي PDA أعطى اقل نمو قطري للفطر *S. sclerotiorum* بلغ ٣,٣٥ سم و بفارق معنوي عن تأثير بقية قيم الرقم الهيدروجيني التي لم تختلف فيما بينها معنويا اعطى فيها الرقم الهيدروجيني ٧ اعلى معدل للنمو القطري للفطر بلغ ٥,٩٦ سم .

و من نتائج الجدول نفسه تبيّن ان مدة الحضن ٧ يوم تفوقت على مدة الحضن ٥ يوم معنويا إذ اعطت معدل نمو قطري للفطر بلغ ٧,١٨ سم مقارنة بالمدة ٥ يوم التي اعطت معدل نمو قطري للفطر بلغ ٢,٩٦ سم . اما التداخل بين الرقم الهيدروجيني و مدة الحضن فقد كان لها تأثير معنوي في معدل نمو الفطر *S. sclerotiorum* إذ كان اعلى معدل نمو قطري للفطر ٨,٥ سم عند الرقم الهيدروجيني ٦ و مدة حضن ٧ يوم ، بينما اقل معدل نمو قطري للفطر كان ١,٦٥ عند pH ٥,٥ و مدة حضن ٥ يوم .

يتضح من الشكل (١٠) بأن الرقم الهيدروجيني ٦ كان الأعلى في نسبة نمو الفطر و التي بلغت ١٠٠٪ تلاه الرقم ٧ بنسبة ٩٦٪ ثم الرقم ٥ بنسبة ٩٠٪ و الرقم ٧,٥ بنسبة ٨٩٪ و الرقم ٦,٥ بنسبة ٧٢,٧٪ و اخيرا الرقم ٥,٥٪ الذي سجل نسبة نمو بلغت ٥٩٪ ، في حين بلغت اعلى نسبة مئوية لنمو الفطر بعد ٥ يوم من الحضن عند الرقم ٧ و ٧,٥ إذ كانت ٤٤٪ ثم الرقم ٦,٥ بنسبة ٣٨,٨٪ و تلاه الرقم ٥ بنسبة نمو ٣٣,٨٪ والرقم ٦ بنسبة ٢٨,٨٪ ثم الرقم ٥,٥ الذي سجل أدنى نسبة لنمو الفطر إذ بلغت ١٩٪ .

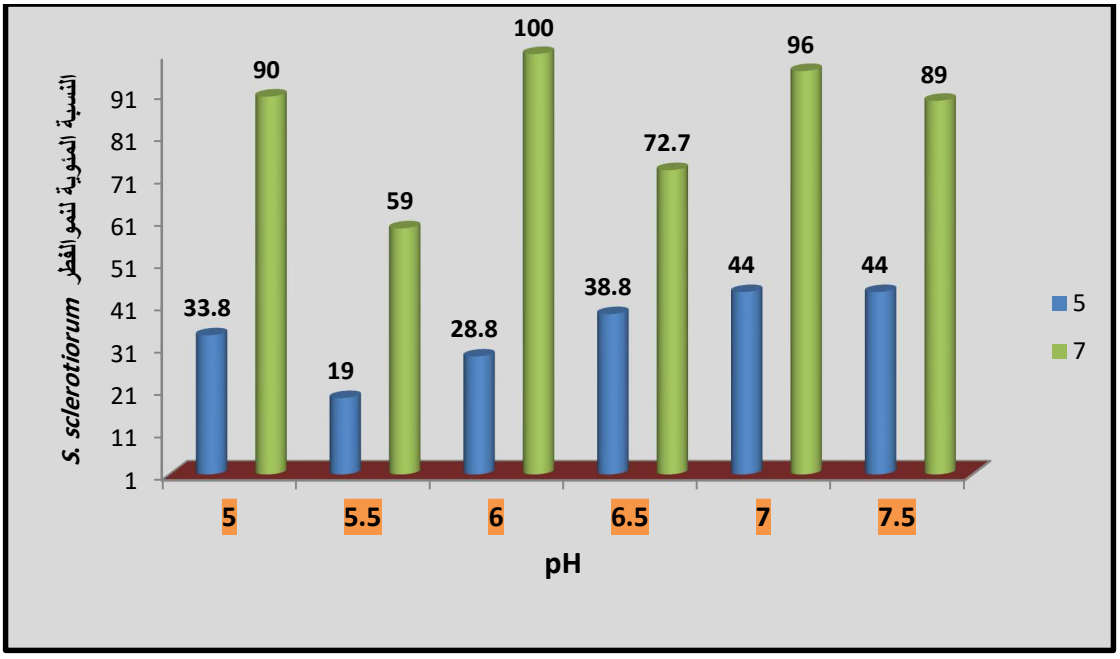
ان التغير الحاصل في الرقم الهيدروجيني للوسط يؤثر في النشاط الفطري (السعد، 1990) ، فقد تغيرت مستويات نمو الفطر بتغير مستوى الحموضة ، إذ كان الرقم الهيدروجيني 7 هو الامثل لنمو الفطر ، و هذه النتيجة لا تتفق مع Cuong و Dohroo، (2006) الذي بين أنّ الرقم الهيدروجيني 5 هو الامثل للنمو الخضري الفطر ، اما المدى الواسع من الارقام الهيدروجيني و التي مكنت الفطر من النمو فهي تتفق مع Willetts و Wong، (1980) الذي اوضح امكانية الفطر *S. sclerotiorum* على النمو في الارقام الهيدروجينية 3.5 – 7.5 ، كما ذكر Marukawa و أخرون، (1975) ان الفطر ينمو و ينتج اجسام حجرية في و سط فيه مدى من الارقام الهيدروجينية 2.5 – 9 . يمتاز سايتوبلازم الخلية الفطرية بكونه غير ناضح لأيونات الهيدروجين و الهيدروكسيل لذلك فأنه يمكن ان يبقى محافظا على نسبته من الأيونات الموجودة ، لكن الأنزيمات الموجودة في الغشاء السايتوبلازمي نفسه تتأثر بتركيز ايون الهيدروجين مما

يؤدي الى تأثر الفعاليات الأخرى منها ألفة هذه الأنزيمات تجاه المواد المذابة في الوسط (السعد، 1990) . و أشار Shresti، (2005) الى ان انخفاض الرقم الهيدروجيني للوسط يجعل الغشاء السايتوبلازمي متمسكا بأيونات الهيدروجين إذ تعمل على عرقلة مرور الأيونات الموجبة ، أما عند إرتفاع الرقم الهيدروجيني فتعمل أيونات الهيدروجين على منع مرور الأيونات السالبة الضرورية .

الجدول (11) تاثير الرقم الهيدروجيني و مدة الحضن في معدل النمو القطري لفطر *S. sclerotiorum* (سم) و بدرجة حرارة 20 ± 2 °م .

الرقم الهيدروجيني pH	مدة الحضن (يوم)		معدل تأثير الرقم الهيدروجيني pH
	5	7	
5	2.88	7.66	5.27
5.5	1.65	5.05	3.35
6	2.45	8.5	5.47
6.5	3.3	6.18	4.74
7	3.76	8.16	5.96
7.5	3.76	7.58	5.67
معدل تأثير مدة الحضن	2.96	7.18	

العامل	الرقم الهيدروجيني	مدة الحضن	التداخل
$L.S.D_{0.05}$	1.224	0.707	1.731



الشكل (10) تاثير الرقم الهيدروجيني pH في النسبة المئوية لنمو الفطر *S. sclerotiorum* بعد ٥ و ٧ ايام من الحضن .

4 – ٨ – 4. تأثير الرقم الهيدروجيني pH في النسبة المئوية لإنتاج حامض الأوكزاليك

أظهرت النتائج في الجدول (12) بأن الرقمان الهيدروجينيين 7 و 7.5 ، للوسط الغذائي PDA أعطيا اقل نسبة مئوية في انتاج حامض الأوكزاليك من الفطر *S. sclerotiorum* بلغت ٤٤,٢٥ لكل منهما و بفارق معنوي عن تأثير بقية قيم الرقم الهيدروجيني التي لم تختلف فيما بينها معنويا أعطى فيها الرقم الهيدروجيني 7 أعلى نسبة في انتاج حامض الأوكزاليك من الفطر بلغت ٩٧,٢٥ . هذه النتائج لا تتفق مع Culberston و آخرون، (2007) الذي وجد اعلى كمية لإنتاج الحامض عند الرقم الهيدروجيني. 4.5 بوجود الكلوكوز كمصدر كاربوني اضافة الى عناصر اخرى مثل Malate و Acetate .

أشار Maxwell و Lumsden، (1970) الى أنّ الرقم الهيدروجيني لوسط النمو يؤثر في تنظيم انتاج و تراكم الحامض في الفطر *S. sclerotiorum* ، كما بين ايضا بان انخفاض

الرقم الهيدروجيني في الانسجة النباتية المصابة يحفز الفطر على انتاج الحامض لتوفير الظروف الملائمة لعمل الأنزيمات المحللة للجدار الخلوي النباتي ، و اوضح بين Beaulieu، (2008) ان الفطر *S. homoeocarpa* يتأثر في انتاجه لحامض الاوكزاليك بالرقم الهيدروجيني ، إذ يبدأ الفطر بإنتاج الحامض في و قت مبكر عند الظروف البيئية المتجهة نحو القاعدية . ذكر Daniel و آخرون، (2007) أنّ عدد من السكريات المتعددة و البسيطة تؤثر في انتاج و تنظيم الأوكزالات في الفطر *S. sclerotiorum* إذ تؤدي الى زيادة الرقم الهيدروجيني في الوسط و بالتالي زيادة تراكم الاوكزالات .

الجدول (12) تاثير الرقم الهيدروجيني pH في النسبة المئوية لإنتاج حامض الاوكزاليك Oxalic Acid من الفطر *S. sclerotiorum* .

الرقم الهيدروجيني pH	النسبة المئوية لحامض الأوكزاليك
5	47.5
5.5	44.25
6	44.25
6.5	47.5
7	97.25
7.5	51
$L.S.D_{0.05}$	0.188

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions & Recommendations

الاستنتاجات

أظهرت نتائج الدراسة ما يأتي :

1 – امتاز الفطر *S. sclerotiorum* بتوزيع الأجسام الحجرية بنمط منتظم و غير منتظم و هذا يؤثر على مدى إمراضية الفطر .

2 – ان الفطريات *A. niger* ، *A. terreus* و *Penicillium sp.* هي اكثر الأنواع الفطرية تطفلا على الأجسام الحجرية و شكلت الانواع العائدة للفطر *Aspergillus* نسبة ظهور عالية مقارنة مع الفطر *Penicillium sp.* .

3 – امتاز راشح الفطرين *T. harzianum* و *Penicillium sp.* بالأثر التثبيطي الكبير في نمو الفطر *S. sclerotiorum* ، و ازداد معدل التثبيط مع زيادة التركيز .

4 – احتوت مستخلصات الرواشح الفطرية على بقع متميزة في صفائح TLC و اشترك بعضها في قيم التحرك النسبي .

٥ – احتوت المستخلصات على عدد من المركبات الكيميائية التي تباينت في ظهورها بين فطر و اخر .

٦ – الفطر *S. sclerotiorum* ينمو بسرعة في الوسط الغذائي CDA و الوسط PDA ، في حين سُجلت اعلى نسبة مئوية لإنتاج حامض الأوكزاليك كانت في وسط SDA .

٧– الرقم الهيدروجيني 7 كان الأمثل لنمو الفطر و لإنتاج حامض الأوكزاليك .

التوصيات

بهدف استكمال الدراسة و البحث حول استخدام بعض الفطريات في المكافحة الاحيائية للفطر *S. sclerotiorum* نوصي بما يأتي :

1 – أجراء دراسة موسعة لعزل انواع الفطريات المتطفلة على الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* و تشخيصها في ترب لمناطق مختلفة .

2 – استخلاص اهم المركبات الفعالة في رواشح الفطريات المستخدمة في مكافحة الفطر *S. sclerotiorum* و تنقية كل منها على حدة و هذا يفسح المجال لدراسات واسعة .

3 – أجراء دراسة شاملة بشأن تأثير العوامل البيئية على امراضية الفطر و انتاج الأجسام الحجرية .

٤ – دراسة جزيئية للفطر *S. sclerotiorum* لمعرفة الجين المسئول عن انتاج حامض الأوكزاليك و محاولة السيطرة عليه .

المصادر

References

المصادر العربية

- **اكريوس، جورج ن . (1985) .** علم امراض النبات . وزارة التعليم العالي و البحث العلمي . جامعة صلاح الدين .
- **الإمام ، محمد محمد الطاهر (2007).** تصميم و تحليل التجارب . دار المريخ للنشر ، المملكة العربية السعودية ، ط1 : 408 صفحة.
- **السعد ، مها رؤوف (1990).** فسلجة الاحياء المجهرية . الطبعة الثانية . جامعة بغداد ، بغداد.
- **الشيخلي، محمد عبد الستار و عبد الجليل فريال حسن و العزاوي، حسن فياض (1993).** الكيمياء الحياتية العملي ، الجامعة المستنصرية.
- **الكعبي ، عقيل نزال و حيدر محمد حسن و صالح عبد الواحد (2010).** تأثير بعض عوامل المقاومة الاحيائية في مقاومة مرض تعفن بذور و موت نباتات الطماطة المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* Kühn ، مجلة جامعة بابل ، المجلد 18 ، العدد 1.
- **محمد ، بان طه (2001).** دراسة حياتية للفطر *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary و استخدام البسترة الشمسية في السيطرة عليه ، اطروحة دكتوراه فلسفة ، كلية العلوم ، جامعة بابل ، 87 صفحة.
- **محمد ، بان طه و المظفر ، و حيدر عبد المنعم (2013) .** تشخيص سلالة الفطر *Sclerotinia sclerotiorum* باستعمال الـ PCR و تقدير حامض الأوكزاليك المنتج تحت ظروف بيئية و كيميائية مختلفة ، مقبول للنشر في مجلة الفرات للعلوم الزراعية ، المجلد ٥، العدد 3 .

المصادر الأجنبية

- ABD-ELmagid, A. (2012). Water potential interaction with host and pathogen and development of a multiplex PCR for *Sclerotinia* species. Ph. D. Thesis. Oklahoma State University.pp. 116.
- Adebola, M.O. & Amadi, J. E. (2010). Screening three *Aspergillus* species for antagonistic activities against the cocoa black pod organism (*Phytophthora palmivora*), Agric. Biol. J. N. Am., 1(3): 362 – 365.
- Adedayo, O. ; Anderson, W. , Younge, M. , Sncickus, V. , Patil, P. & Kolawole, D. (2001). Phytochemistry and antibacterial activity of *Senna alata* flower, Pharmacut . Biol . 39 : 1 – 5.
- Agnihotri, J. P. & Rai, R. P. (1971). Influence of nutrition and pH on growth and sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary from *Gaillardia pulchella* foug, Mycopathologia et Mycologia Applicata, 43(1): 89 – 95.
- Ahmed, M. ; Nazil, S. & Anwar, M. (1989). Studies on tannins from bark of *Pinus rox burghii*, J. Chem. Soc. Pakistan, 11: 213 – 217.
- Akrami, M. ; Golzary, H. & Ahmadzadeh, M. (2011). Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species *Fusarium* rot of lentil, African Journal of Biotechnology, 10: 2653 – 2658.
- Alam, S. S. ; Sakamoto, K. , Amemiya, y. & Inubushi, K. (2010). Biocntrol of soil-born *Fusarium* wilts of tomato and cabbage with a root-colonizing fungus, *Penicillium sp*. EU0013. World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World. Pp. 3.

- Ali Siddiqui, I. ; Zareen, A. & Shaukat, S. S. (2001). Cytotoxicity assay of some fungal filtrates using *Artemia salina* leach (brine shrimp), Pakistan Journal of Biological Sciences, 4(3): 356 – 358.
- Ali, A. ; Haider, M. S. , Khokhar, I. , Bashir, U. , Mushtaq, S. & Mukhtar, I. (2011). Antibacterial activity of cultyre extracts of *Penicillium* species against soil-borne bacteria, Mycopath., 9(1):17 – 20.
- AL-Khazragi, S. M. (1991). Biopharmacological study of *Artemisia herbaalba*. M. Sc. Thesis. Baghdad University.
- Alwathnani, H. A. & Perveen, K. (2012). Biological control of *Fusarium* wilt of tomato by antagonist fungi and cyanobacteria, African Journal of Biotechnology, 11(5): 1100 – 1105 .
- Amin, F. ; Razdan, V. K. , Mohiddin, F. A. , Bhat, K. A. & Sheikh, P. A. (2010). Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in –vitro*, J. Phytol., 2(10): 34 – 37.
- Amselem, J. ; Cuomo, C. A. , Van Kan, J. A. L. , Viaud, M. , Benito, E. P. , Couloux, A. , Coutinho, P. M. , De Vries, R. P. & Dyer, P. S. (2011). Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*, PLoS Genetic, 7(8): 1 – 27.
- Anand, S. & Reddy, J. (2009). Biocontrol potential of *Trichoderma sp*. Against plant pathogens, International Journal of Agriculture Sciences, 1(2): 30 – 39.
- Andersen, B. (1991). Consistent production of phenolic compounds by *Penicillium brevicompactum* for chemotaxonomic characterization . Antonie Van Leeuwenhoek. 60(2) : 115 – 23.

- Anstis, S. (2004). *Penicillium radicum* : studies on the mechanisms of growth promotion in wheat . Ph. D. Thesis. School of Earth and Environmental Sciences. The University of Adelaide, Australia.
- Aurelija, L. ; Zilvinas, L. & Vytautas, R. (2012). Relationships among alfalfa resistance to *Sclerotinia* crown and stem rot, *Sclerotinia trifoliorum* and oxalic acid, African journal of biotechnology, 11(72): 13690 – 13696.
- Awaad, A. S. ; Nabilah, A. A. & Zain, M. E. (2012). New antifungal compounds from *Aspergillus terreus* isolated from desert soil, Phytother. Res.pp. 5.
- Baker, K. F. & Cook, R. J. (1974). Biological control of plant pathogens, W. H. Freeman and company San Francisco. pp. 423.
- Baker, R. (1968). Mechanism of biological control of soil born pathogens, Ann. Rev. Phytopathology, 6: 263 – 293.
- Barari, H. ; Alavi, V. & Badalyan, S. M. (2010). Genetic and morphological diversities in *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in northern parts of Iran, World Applied Sciences Journal, 8(3): 326- 333.
- Bashi, Z. D. (2011). *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenicity: Factors Regulation and interaction with the host. Ph. D. Thesis. Department Of food and bioproduct Science. University of Saskatchewan .
- Bateman, D. F. & Beer, S. V. (1965). Simultaneous production and Synergistic action of oxalic acid and poly galacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*, Phytopathology, 55: 204 – 211.

- Beaulieu, R. A. (2008). Oxalic acid production by *Sclerotinia homoeocarpa*: the causal agent of dollar spot, the under graduate colleges of the Ohio state university, S. H. Thesis.
- Bell, D. K. ; Wells, H. D. & Markham, C. R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens, Phytopathol., 72: 379 – 382.
- Benzohra, I. E. ; Bendahmane, B. S. , Labdi, M. & Bnekada, M. Y. (2011). *In vitro* biocontrol using the antagonist *Trichoderma harzianum* against the algerian isolates of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., the agent of *Ascochyta* blight in chickpea (*Cicer arietinum* L.), Intl. J. Microbiol. Res., 2(2): 124 – 128.
- Bollag, J. M. ; Sjoblad, R. D. & Minard, R. D. (1977). Polymerization of phenolic intermediates of pesticides by a fungal enzyme, Experientia, 33(12): 1564 – 1566.
- Bolton, M. D. ; Thomma, B. P. H. J. & Nelson, B. D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen, MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, 7(1): 1 – 16.
- Booth, T. ; Gorrie, S. & Mabsin, T. M. (1988). Life strategies among fungal ; assemblages on *Salicornia europase* agg, Mycol., 80: 176 – 191.
- Brazezinska, M. S. & Jankiewicz, U. (2012). Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control, Curr. Microbial, 65: 666 – 672.
- Bryan, J. ; Culbertson, B. J. ; Krone, J. ; Gatebe, E. ; Furumo, N. C. & Daniel, S. L. (2007). Impact of carbon sources on growth and

oxalate synthesis by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* . *World J Microbial Biotechnol*.

- Caliskan, M. (2000). The metabolism of oxalic acid, Turk. J Zool., 24: 103 – 106.
- Calvo, A. M. ; Wilson, R. A. , Bok, J. W. & Keller, N. P. (2002). Realationship between secondary metabolism and fungal development , Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66(3): 447 – 459.
- Castillo, F. D. H. ; Padilla, A. M. B. , Morales, G. G. , Siller, M. C. , Herrea, R. R. , Gonzales, C. N. A. & Reyes, F. C. (2011). *In vitro* antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*, Am. J. Agri. & Biol. Sci., 6(3): 410 – 417.
- Chen, M. ; Shao, C. ; Zhang, J. ; Zhao, D. ; She, Z. & Wang, C. (2013). Bioactive indole alkaloids and phenyl ether derivatives from marine – derived *Aspergillus sp*. fungus . J. Nat. Prod. 76(4): 547 – 53.
- Chhabra, S. C. ; Tarus, P. K. , Lang ' at-Thoruwa, C. & Wanyonyi, A. W. (2004). Fermentation and antimicrobial activities of extracts from different species of fungus belonging to genus , *Trichoderma*, Afr. J. Health. Sci., 11: 33 – 42.
- Choubey, P. (2012). Isolation and characterization of fungal strains as Biocontrol agents, World Journal of Science and Technology, 2(6): 66 – 68.
- Choudary, K. A. ; Reddy, K. R. N. & Reddy, M. S. (2007). Antifungal activity and genetic variability of *Trichoderma harzianum* isolates . J. Mycol. P1 Pathol. 37(2): 1 – 6.
- Choudhary, M. I. ; Musharraf, S. G. , Mukhmoor, T. , Shaheen, F. , Ali, S. & Atta-ur-Rahman (2004). Isolation of bioactive

compounds from *Aspergillus terreus*, Z. Naturforsch, 59b: 324 – 328.

- Clardy, J. ; Freinkman, E. , Oh, DC. , Scott, J. J. & Currie C. R. (2009). Bionectriol A, a polyketide glycoside from the fungus *Bionectria sp*. associated with the fungus-growing ant, *Apterostigma dentigerum*, Tetrahedron let., 50(49): 6834 – 6837.

- Cochrane, v. w. (1958). Physiology of fungi , John Wiley & Sons , New York, pp. 524.
- Culbertson, B. J. ; Krone, J. ; Erastus, G. ; Furumo, N. C. & Steven, L. D. (2007). Impact of carbon sources on growth And oxalate synthesis by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, World J. Microbiol Biotechnol, 23: 1357- 1362.

- Cuong, D. C. & Dohroo, N. P. (2006). Morphological, cultural and Physiological studies on *Sclerotinia sclerotiorum* causing stalk Rot of cauliflower, omonrice, 14: 71 – 77.
- Daniel, S. L. ; Culbertson, B. J. & Furumo, N. C. (2007). Impact of nutritional supplements and monosacchrides on growth, oxalate accumulation, and culture pH by *Sclerotinia sclerotiorum*, FEMS Microbiology Letters, 270(1): 132 – 138.
- De Oliveira, N. T. ; De Figueiredo, G. S. , De Figueiredo, L. C. , Cavalcanti, F. C. N. , Dos Santos, A. C. & Da Costa, A. F. (2010). Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma spp.* and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants, Braz. Arch. Biol. Technol., 53(1): 1 – 9.
- Demirci, E. ; Dane, E. & Eken, C. (2011). *In vitro* antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia on potato tubers against *Rhizoctonia solani*, Turk. J. Biol., 35: 457 – 462.

- Devaki, N. S. & Seema, M. (2012). *In vitro* evaluation of biological control agents against *Rhizoctonia solani*, Journal of Agricultural Technology, 8(1): 233 – 240.
- Dharmaputra, O. S. ; Putri, A. S. R. , Retnowati, I. & Santiambarwati (2003). Antagonistic effect of three fungal isolates to aflatoxin-producing spergiY/HS/JavHS, BIOTROPIA, 21: 19 – 31.
- Dhliwayo, T. (2008). Alternative products in the inhibition of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* on potato production. M. Sc. Thesis. Nelson Mandela Metropolitan University.pp. 80.
- Dickman, M. B. & Chen, C. (2005). cAMP blocks MAPK activation and sclerotial development via Rap-1 in a PKA – independent manner in *Sclerotinia sclerotiorum*, Molecular Microbiology, 55(1): 299 – 311.
- Ellis, D. H. (1994). Clinical Mycology : the human opportunistic mycosis., Gillingham printers pty. Ltd. Australia: 166pp.
- Farooq, S. S. ; Iqbal, M. & Abdul Rayf, C. (2005). Physiological studies on *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceri, Journal of Agriculture & Biology, 7: 275 – 277.
- Fawzy, G. A. ; AL-Taweel, A. M. & Melake, N. A. (2011). In vitro antimicrobial and anti-tumor activities of intracellular and extracellular extracts of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* var. *columinaris*, J. Pharm. Sci. & Res., 3(1): 980 – 987.
- Fernando, W. G. ; Nakkeeran, S. & Zhang, Y. (2004). Ecofriendly methods in combating *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, Recent res. Devel. Environ. Boil., 1: 329 – 347.
- Fialho, M. B. ; De Moraes, M. H. D. , Tremocoldi, A. R. & Pascholati, S. F. (2011). Potential of antimicrobial volatile organic

compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds, Pesq. Agropec. Bras. Brasilia, 46(2): 137 – 142.

- Frate, C. A. & Long, R. F. (2005). *Sclerotinia* in alfalfa: biology and Control in the central valley, University of California.
- Georgiou, C. D. ; Zervoudakis, G. & Petropoulou, K. P. (2003). Ascorbic acid might play a role in the sclerotial differentiation of *Sclerotium rolfsii*, Mycologia, 95(2): 308 – 31.
- Grossbard, E. (1952). Antibiotic production by fungi on organic manures and in soil, J. gen. Microbiol., 6: 295 – 310.
- Hansen, M. A. (2009). Timber rot of tomato. Virginia State University.
- Harborne, J. B. (1984). Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. 2nd ed. Chapman and Hall, London , NewYork. pp. 288.
- Hegedus, D. D. & Rimmer, S. R. (2005). *Sclerotinia sclerotiorum* : When " to be or not to be " a pathogen, FEMS Microbiology Letters, 251: 177 – 184.
- Heydari, A. & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists, journal of biological sciences, 10(4): 273 – 290.
- Holligan, P. M. & Lewis, D. H. (1973). The soluble carbohydrates of *Aspergillus clavatus* . Journal of General Microbiology. 75: 155 – 159.
- Howall, C. R. & Stipanovic, R. D. (1983). Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium veren*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*, Con. J. Microbial., 29: 321 – 324.

- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts, Plant Disease, 87(1): 1 – 10.
- Hoyte, S. M. (2012). Epidemiology and management of *Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) de Bary in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* (A. Chev.)). Ph. D. thesis. Massey.pp. 227.
- Hung, H. C. & Yeung, J. M. (2002). Biochemical pathway for the formation of abnormal sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*, Plant Pathology Bulletin, 11: 1 – 6.
- Hussain, A. ; Iqbal, S. M. , Ayub, N. & Haqqani, A. M. (2003). Physiological studies of *Sclerotium rolfsii* , Pakistan J. Plant Pathol., 2(2):102 – 106.
- Ibarra-Medina, V. A. ; Ferrera-Cerrato, R. , Alarcon, A. , Lara-Hernandez, M. A. & Valdez-Carrasco, J. M. (2010). Isolation and screening of *Trichoderma* strains antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*, Revista Mexicana De Micologia, 31: 53 – 63.
- Isogai, A. ; Nakagawa, M. , Sakai, H. & Hirota, A. (1984). Structure of a new antibiotic, terrecyclol, from *Aspergillus terreus* Thom, Agric. Biol. Chem., 48(1): 117 – 121.
- Jones, E. E. & Stewart, A. (2000). Selection of mycoparasites of sclerotia Of *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from New Zealand Soils, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28: 105 – 114.
- Junior, T. J. P. ; Vieira, R. F. , Rocha, P. R. R. , Bernardes, A. , Costa E. L. , Carneiro, J . E. S. , Vale, F. X. R. & Zambolim, L. (2009). White mold intensity on common bean in response to plant

density, irrigation frequency, grass mulching *Trichoderma spp*., and fungicide, Summa. Phytopathol. Botucatu., 35(1): 44 – 48.

- Kang, S. C. & Bajpai, V. K. (2012). *In vitro* and in vivo inhibition of plant pathogenic fungi by essential oil and extracts of *Magnolia liliflora* Desr., J. Agr. Sci. Tech., 14: 845 – 856.
- Khachatourians, G. G. ; Bidochka, M. J. & Low, N. H. (1990). Carbohydrate storage in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, Applied and Environmental Microbiology, 56(10): 3186 – 3190.
- Khanzada, S. A. ; Iqbal, S. M. & Haqqani, A. M. (2003). Physiological studies on *Macrophomina phaseolina*, Mycopath., 1: 4 – 31.
- Knudsen, G. R. & Bae, Y. S. (2007). Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*, Applied Soil Ecology, 35: 21 – 24 .
- Koffas, M. A. G. ; Fowler, Z. L. , Baron, C. M. & Panepinto, J. C. (2010). Melanization of flavonoids by fungal and bacterial laccases, Yeast, 28: 181 – 188.
- Kora, C. ; McDonald, M. R. & Boland, G. J. (2003). *Sclerotinia* rot of carrot an example of phonological adaptation and bicyclic development by *Sclerotinia sclerotiorum*, Plant Disease, 87(5): 456 – 470.
- Kredics, L. ; Antal, Z. , Manczinger, L. , Szekeres, A. , Kevei, F. & Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential, Food Technol. Biotechnol., 41: 37 – 42.

- Kubicek, C. P. & Harman, G. E. (2002). *Trichoderma & Gliocladium* basic biology, taxonomy and genetics, vol. 1. Taylor & Francis e-Library. pp. 278.
- Lal, D. ; Shrivastava, D. , Verma, H. N. & Gardner, J. J. (2012). production of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) from *Aspergillus niger* isolated from bark of *Acacia milotica*, J. Microbiol. Biotech. Res., 2(4): 566 – 572.
- Le Tourneau D. (1979). Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture, Phytopathology, 69(8): 887 – 890.
- Lee, Y. S. ; Singh, R. , Singh, B. K. , Upadhyay, R. S. & Rai, B. (2002). Biological control of *Fusarium* wilt disease of pigeonpea, Plant Pathol. J., 18(5): 279 – 283.
- Li, Y. ; Wu, H. , Yang, H. & You, X. (2012). Isolation and characterization of saponin-producing fungal endophytes from *Aralia elata* in northeast China, Int. J. Mol. Sci., 13: 16255 – 16266.
- Ling, K. H. ; Yang, C. K. ; Kuo, C. A. & Kuo, M. D. (1982). Solvent systems for improved isolation and separation of Territrems A and B . Applied and Environmental Microbiology. 44(4): 860 – 863.
- Lo, C. T. (1998). General mechanism of action microbial biocontrol Agents, Plant Pathology Bulletin, 7: 155 – 166.
- Lo, C. T. ; Nelson, E. B. & Harman, G. E. (1996). Biological control of rye-grass disease with arhizospher competent strain of *Trichoderma harzianum*, Plant Disease, 80: 736 – 741.

- Lu, C. & Mei, X. (2003). Improvement of phenylethanoid glycosides production by fungal elicitor in cell suspension culture of *Cistanche deserticola*, Biotechnology Letters, 25: 1437 – 1439.
- Lu, G. (2003). Engineering *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in oilseed crops, African Journal of Biotechnology, 2(12): 509 – 516.
- Mahmoud, Y. A. G. ; Assawah, S. W. ; EL-sharkawy, S. H. & Abdel-salam, A. (2008). Flavone biotransformation by *Aspergillus niger* and the characterization of two newly formed metabolites. Mycobiology. 36(2): 121 – 133.
- Marciano, P. ; Magro, P. & Favaron, F. (1989). *Sclerotinia sclerotiorum* growth and oxalic acid production on selected culture media . FEMS Micobiology Letters. 61: 57 – 69.
- Marukawa, S. ; Funakawa, S. & Satomura, X. (1975). some physical and chemical factors on formation of sclerotia in *Sclerotinia libertina* Fuckel, Agric. Biol. Chem. 39: 463 – 468.
- Maxwell, D. P. & Lumsden, R. D. (1970). Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture, Phytopathology, 60: 1395 – 1398.
- Maxwell, D. P. (1973). Oxalate formation in *Whetzelinia sclerotiorum* by oxaloacetate acetylhydrolase. Physiol. Mol. Plant Pathol. 3: 279 – 288.
- McLAREN, D. L. ; Huang, H. C. , Kozub, G. C. & Rimmer, S. R. (1994). Biological control of *Sclerotinia* wilt of sunflower with *Talaromyces flavus and Coniothyrium minitans,*Plant Dis., 78: 231 – 235.
- Medic-Saric, M. ; Jasprica, I. , Smolcic-Bubalo, A. & Mornar, A. (2004). Optimization of chromatographic conditions in thin

layer chromatography of flavonoids and phenolic acids, CCACAA., 7(1-2): 361 – 366.

- Melo, I. S. ; Faull, J. L. & Nascimento, R. S. (2006). Antagonism of *Aspergillus terreus* to *Sclerotinia sclerotiorum*, Brazilian Journal of Microbiology, 37: 417 – 419.
- Melo, I. S. ; Moretini, A. ; Cassiolato, A. M. R. & Faull, J. L. (2011). Development of mutants of *Coniothyrium minitans* improved efficiency for control of *Sclerotinia sclerotiorum*, Journal of Plant Protection Research, 51(2) :179 – 183.
- Meng, S. X. ; Wu, BM. , Ludy, R. L. , Fraley, C. L. & Osterbauer, N. K. (2011). Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on whitloof chicory (*Cichorium intybus* L.) in Oregon. The 3rd NPDN National Meeting Berkeley, California.
- Meyer, E. & Walther, A. (1988). Methods for the estimation of protein , lipid, carbohydrate and chitin in fresh water invertebrates, J. Arch. Hydroboil., 13: 161 – 177.
- Michael, J. B. ; Gardiner, R. B. & Day, A. W. (2009). Melanin Synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum* , Mycologia, 101(3): 296– 304.
- Murugan, K. ; Saravanababu, S. & Arunachalam, M. (2007). Screening of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process, Bioresource Technology, 98: 946 – 949.
- Mwangi, E. S. K. ; Gatebe, E. G. & Ndung'u, M. W. (2012). Impact of nutritional (C:N ratio and source) on growth, oxalate accumulation, and culture pH by *Sclerotinia sclerotiorum*, Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 2(10): 2224 – 3208.

- Narayana, K. J. P. ; Srikanth, M. , Vijayalakshmi, M. & Lakshmi, N. (2007). Toxic spectrum of *Aspergillus niger* causing black mold rot of onions, Res. J. Microbiol., 2(11): 881 – 884.
- Neill, J. C. (1937). The mould of fungi of new Zealand. pp. 15.
- Nicoletti, R. & Stefano, M. D. (2012). *Penicillium restrictum* as an antagonist of plant pathogenic fungi, Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology, 6(2): 61 – 69.
- Ojaghian, M. R. (2009). First report of *Sclerotinia sclerotiorum* on potato plants in iran, Australasian Plant Disease Notes, 4: 39 – 41

  .
- Olsen, N. ; Miller, J. , Nolte, P. & Miller, T. (2003). White mold and potatoes. University of Idaho.
- Ownley, B. H. & Benson, D. M. (1992). Evalution of *Penicillium janthinellum* as a biological control of *Phytophthora* root rot of azalea, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 117(3): 407 – 410.
- Packter, N. M. (1969). Studies on the biosynthesis of phenols in fungi, Biochem. J., 114: 369 – 377.
- Padmini, P. P. & Praveena, Y. (2011) . Antibacterial activities of mycotoxins from newly isolated filamentous fungi. International Journal of Plant , Animal and Environmental Sciences.1(1): 8 – 12.
- Pal, K. K. & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens, The Plant Health Instructor. pp. 25.
- Pandya, U. & Saraf, M. (2010). Application of fungi as a biocontrol agent and their Biofertilizer potential in agriculture, J. Adv. Dev. Res., 1(1): 90– 99.
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*, biology , ecology and potential for biocontrol, Ann. Rev. Phtyopathology, 23: 23 – 54.

- Peltier, A. J. ; Bradley, C. A. , Chilvers, M. I. , Malvick, D. K. , Daren, S. M. , Wise, K. A. & Esker, P. D. (2012). Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean, J. Integ. Pest. Mngmt., 3(2): 1 – 7.
- Petrofeza, S. & Nasser, L. C. B. (2012). Case study : *Sclerotinia sclerotiorum* : genetic diversity and disease control, The Molecular Basis of Genetic Diversity. pp. 374 .
- Prince, L. ; Raja, A. & Prabakaran, P. (2011). Antagonistic potentiality of some soil mycoflora against *Colletotrichum falcatum*, World Journal of Science and Technology, 1(4): 39 – 42.
- Purdy, L. H. (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*: history, disease and Symptomatology, host range, geographic distribution, and impact, Phytopathology, 69(8): 875 – 880.
- Rabeendran, N. ; Jones, E. E. & Stewart, A. (1998). Isolation and *in vitro* screening of soil fungi for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*, Microbial Control of Plant Pathogens, :102 – 106.
- Rai, J. N. & Saxena, V. C. (1975). Sclerotial mycoflora and its role in natural biology of white rot disease , Plant Soil, 43: 509 – 503.
- Reshu & Khan, M. M. (2012). Role of different microbial - origin bioactive antifungal compounds against *Alternaria spp*. causing leaf blight of mustard, Plant Pathology Journal, 11(1): 1 – 9.
- Robbins , W. J. (1937). The Assimilation by plants of various forms Of nitrogen , Amer. J. Bot., 24: 243- 250.
- Safaie, N. ; Karimi, E. & Shams-bakhsh, M. (2011). Assessment of genetic diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* populations in canola fields by Rep-PCR, Trakia Journal of Sciences, 9: 62 – 68.

- Safavi, S. A. ; Farooq, A. S. ; Aziz, K. P. ; Reza, R. G. ; Ali, R. B. & Tariq, M. B. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entamopathogenic fungus *Beauvena bacissiana* FEMS , Microbiology letters , 270(1): 116 – 123 .
- Sahab, A. F. (2012). Antimicrobial efficacy of secondary metabolites of *Beauveria bassiana* against selected bacteria and phytopathogenic fungi, Journal of Applied Sciences Research, 8(3): 1441 – 1444.
- Saharan, G. S. & Mehta, N. (2008). *Sclerotinia* diseases of crop plants : biology, ecology and disease management, Department of Scientific and Industrial Research, New Zealand, :531 pp.
- Sahile, S. ; Sakhuja, P. K. , Fininsa, C. & Ahmed, S. (2011). Potential antagonistic fungal species from Ethiopia for biological control of chocolate spot disease of faba bean, African Crop Science Journal, 19(3): 213 – 225.
- Santamarina, M. P. ; Rosello, J. , Liacer, R. & Sanchis, V. (2002). Antagonistic activity of *Penicillium oxalicum* Corrie and Thom, *Penicillium decumbens* Thom and *Trichoderma harzianum* Rifai isolates against fungi, bacteria and insects *in vitro*, Rev. Iberoam. Micol., 19: 99 – 103.
- Sempere, F. & Santamarina, M. P. (2010). Study of the interactions between *Penicillium oxalicum* Currie & Thom and *Alternaria alternate* (FR.) Keissler, Brazilian Journal of Microbiology. Pp. 7.
- Sharma, P. ; P, V. K. , R, R. , K, S. , S, D. , M, S. , S, M. & S, D. (2011). Biocontrol genes from *Trichoderma* species: a review, African journal of biotechnology, 10(86): 19898 – 19907.
- Shresti, R. A. Y. (2005). Studies on collar rot complex of coleus forskohlii (wild.) Briq. M. Sc. Thesis. University of Agricultural Sciences . Collage of Agriculture, Dharwad. pp. 100.

- Singh, R. K. & Singh, R. N. (2011). Effect of bio-control agents on muskmelon wilt (*Fusarium oxysporum*), Research Journal of Agricultural Sciences, 2(2): 272 – 275.
- Smith, D. L. (2004). Biology and epidemiology of *Sclerotinia minor on* Peanut (*Arachis hypogaea* L.) M. Sc. Thesis . North Carolina state university . 105.
- Steadman, J. R. ; Rutledge, S. , Merrell, D. & Wysong, D. (1995). *Sclerotinia* stem rot of soybean, University of Nebraska-Lincoln.pp. 1256.
- Steadman, J. R. (1979). Control of plant disease caused by *Sclerotinia* species, Phytopathology, 69(8): 904 – 907.
- Steadman, J. R. ; Schwartz, H. F. & Harveson, R. M. (2011). White mold of dry beans. Colorado State University. pp. 3.
- Stotz, H. U. & Guimaraes, R. L. (2004). Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection, Plant Physiology, 136: 3703 – 3711.
- Suleman, p ; Abdullah, m. t. & ali, n. y. (2008). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with Trichoderma harzianum and *Bacillus amyloliquefaciens*, Crop Protection, 27: 1354-1359.
- Takahashi, J . A. ; Petit, P. , Lucas, E. M. F. , Abreu, L. M. & Pfenning, L. D. (2009). Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium sp*. isolated from brazilian cerrado soil, Electronic Journal of Biotechnology, 12(4): 1 – 9.
- Tanrikut, S. & Vaughan, E. K. (1951) . Studies on the physiology of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phylopath., 41: 1099--1103.

- Tariq, M. ; Mirza, J. H. & Shakir, A. B. (1993). Physiological studies of *Botrytis gladiolorum* and its in vitro sensitivity to fungicides, Pakistan J. Phytopathol., 5: 89 – 92.
- Thanaboripat, D. ; Thawai, C. , Jindaporn, N. , Mathurot, O. & Kongniam, O. (2011). Growth inhibition of *Aspergillus* IMI 242684 by crude extract of *Penicillium sp*., KMITL Sci. Tech. J., 11(2): 79 – 84.
- Thom, C. & Raper, K. B. (1945). A manual of the *Aspergilli*. The Williams & Wilkins Company. U. S. A. pp. 373.
- 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.
- Tuite, J. (1969). Plant pathological methods: fungi and bacteria, Burgess Publishing Company Minneapolis, Minnesotta. pp. 239.
- Uma, M. N. & Aiswarya, K. (2012). Conversion of natural wastes into sugar by *Trichoderma viride* . International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences. 3(2): 8 – 12.
- Vaish, D. K. & Sinha, A. P. (2006). Evalution of fungal antagonists against *Rhizoctonia solani* causing sheath bligt of rice, Indian J . Agric. Res., 40(2): 79 – 85.
- Vega, R. R. ; Corsini, D. & Le Tourneau, D. (1970). Nonevolatile organic acids produced by *Sclerotinia sclerotiorum* in synthetic liquid media. Mycologia. 62: 332 – 338.
- Vinale, F. ; Marra, R. ; Scala, F. ; Ghisalberti, E. L. ; Lorito, M. & Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. Letters Appl. Microbiol. 43(2): 143 – 148.

- Vinokurova, N. G. ; Baskunov, B. P. ; Zelenkova, N. F. & Arinbasarov, M. U.(2004). The alkaloids of *Penicillium aurantiogriseum* dierckx (1901) *var*. *aurantiogriseum* VKM F-1298. Microbiology. 73(4) : 414 – 419.
- Vinokurova, N. G. ; Boichenko, L. V. & Arinbasarov, M. U. (2003). Production of alkaloids by fungi of the genus *Penicillium* grown on wheat grain, Applied Biochemistry and Microbiology, 39(4): 403 – 406.
- Vinokurova, N. G. ; Khmel'nitskaya, I. I. Baskunov, B. P. & Arinbasarov, M. U. (2003). Occurrence of indole alkaloids among secondary metabolites of soil *Aspergillus spp*. Applied Biochemistry and Microbiology. 39(2): 192 – 196.
- Willetts, H. J. (1969). Structure of the outer surfaces of sclerotia of certain fungi, Arch. Mikrobiol., 69: 48 – 53.
- Willetts, H. J. & Wong, J. A. L. (1980). The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature, *The Botanical Review*,46: 101 – 165.
- Yuan, X. H. ; Guo-Bo, X. ; Wei-Lin, W. ; Yang, T. & Guo-You, L. (2012). Peniciside, a new triterpenoid glycoside , from the fungus *Penicillium sp*. 169. Archives Pharmacal Research. 35(2): 311 – 314.
- Zamani, MR.; Matroudi, S. & Motallebi, M. (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.
- Zareen, A. ; Zaki, M. J. & Khan, N. J. (2001). Effect of fungal filtrates of *Aspergillus* species on development of root-knot

nematodes and growth of tomato(*Lycopersicon esculentum* Mill.), Pakistan Journal of Biological Sciences, 4(8): 995 – 999.

- Zhang, G. L. ; Guo-You, L. ; Bo-Gang, L. ; Yang, T. ; Yin, J. H. ; Hua-Yi, Q. & Liu, G. Y. (2005). Sesterterpenoids, terretonins A-D, and an alkaloid, asterrelenin, from *Aspergillus terreus*. Journal of natural products. 68(8): 1243 – 1246.

الخلاصة

Summary

Summary

Laboratory experiments were Conducted at biology department , education college for pure science , University of Karbala to study the effect of some fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in addition to the *Trichoderma harzianum* on the radial growth of *S. sclerotiorum* . The effect of Some ecological factors i.e. media and the pH on the radial growth and oxalic acid production were also studied.

Results revealed that there were two types of distribution i.e. regular and irregular distribution., There were three fungi accompanied the sclerotia were tested which were *Aspergillus niger* , *Aspergillus terreus* and *Penicillium sp*. , The species of *Aspergillus* had occurrence rate as compare with *Penicillium sp*. . Crude extracts of fungi isolated from the sclerotia and extract of the *T. harzianum* were used at different concentrations of 15%, 30%, 45% and 60% to study their effect on the growth of *S. sclerotiorum* grown on PDA containing these filtrates. It was that, *T. harzianum* extract inhibited the fungus growth by 100% at the concentrations of 45% and 60%.The extract of *Penicillium sp.* gave 100% inhibitory effect at 60% concentration, Whereas *A. terreus* gave 60% inhibition at 45% and 60% concentrations . Meanwhile, *A. niger* gave the lowest inhibition percentage which was 58.8% at the concentration of 60% .

Thin Layer Chromatography technique (TLC) showed that the fungal extracts contained various compounds in their Rf. These extracts differed in their spots number on (TLC). The fungus of *T. harzianum*, *A. terreus*, *A. niger* and *Penicillium sp*. gave 23, 21, 20 and 16 spots respectively . Results of using different chemical reagents appeared that

fungal extracts contained many active compounds. All extracts contained alkaloids, tannins and carbohydrates . Phenols were absent in all extracts . The fungus of *A. niger* had contained flavonoids but did not contain saponins and glycosides . Meanwhile *A. terreus* had contained all three previous compounds. The *Penicillium sp*. extract had contained saponins and glycosides , while it does not contain flavonoids . *T. harzianum* had contained glycosides and did not contains saponins and flavonoids.

Concerning the effect of fungal extracts on the growth of *S. sclerotiorum*, *A. terreus* extract gave an inhibitory rate 1.375 mm followed by *Penicillium sp*. which gave a rate did not significantly differ from the control treatment which was a 0. 375 mm . On the other hand neither *A. niger* nor *T. harzianum* extracts gave any inhibitory effect. The study also included the antagonistic mechanism of isolated fungi from sclerotia of *S. sclerotiorum* as well as *T. harzianum* as one of the important mechanisms in the biological control against *S. sclerotiorum* . *A. terreus* showed high antagonistic efficiency while it was gradually decreased with other fungi.

Regarding the effect of some ecological factors on *S. sclerotiorum* and oxalic acid production, *S. sclerotiorum* grown on either PDA or CDA gave the highest levels where the fungus occupied all petri dish area giving 100% growth rate at the 7^{th} day of incubation. While it decreased with OA and SDA medium . The fungus gave the highest percentage of oxalic acid production when it grew on SDA as compared with other media . The pH at 6 gave the highest growth percentage at the 7^{th} day whereas pH 7 gave highest impact of pH on the growth rate of fungus on PDA . The pH 7 gave the highest rate of oxalic acid production . Meanwhile the rate of oxalic acid was decreased highly at pH 5, 5.5, 6, 6.5 and 7.5 .

Ministry of Higher Education & Scientific Research
University of Karbala / College of Education for
Pure Science – Department of Biology

Effect of *Trichoderma harzianum* and Some Fungi Accompanied with *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary and Environmental Factors on Sclerotia and Oxalic Acid Production

A thesis
submitted to the Council of The College of Education for Pure Sciences , University of Karbala in partial fulfillment of requirements for the degree of Master of Science

In

Biology – (Botany)

by

Maytham Naser Neamah AL- Joboury

(B. Sc. Biology / 2007)

Supervised By

Prof. Dr. B. T. Mohammad

1434 AH **2013 AD**