



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء

كلية التربية للعلوم الصرفة - قسم علوم الحياة

دراسة الخصائص المظهرية والجزيئية للفطر *Sclerotinia*

sclerotiorum(Lib.)De Bary في محافظة بابل وظروف

إنتاجه للأجسام الثمرية

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة ماجستير علوم في

علوم الحياة / علم النبات

من قبل

نادية نايف حسين محمد المسعودي

بكالوريوس في علوم الحياة/كلية التربية للعلوم الصرفة

جامعة كربلاء/2011

بإشراف

أ. د. بان طه محمد

2015 م

1437 هـ

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

وَعَلَّمَكَ مَا لَمْ تَكُن تَعْلَمُ وَكَانَ فَضْلُ اللّٰهِ
{ عَلَيْكَ عَظِيْمًا }

صدق الله العلي العظيم

سورة النساء : آیه 113

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين و الصلاة و السلام على اشرف الخلق و المرسلين ابي القاسم محمد (صلى الله عليه) و على آل بيته الطيبين الطاهرين...

أتوجه بشكري الجزيل لأستاذتي الفاضلة الدكتورة بان طه محمد التي تفضلت بالإشراف على إعداد هذه الرسالة ولما قدمته لي من مساعدة ودعم ، وإخراج الرسالة بهذا الشكل . كما أتوجه بالشكر إلى كل من في عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ، و رئاسة القسم علوم الحياة ادارة واساتذة لما قدموه. واتوجه بالشكر الجزيل إلى كلية الزراعة وبالأخص الدكتورة رجاء غازي لما أبدوه من مساعدة لإنهاء الجزء العملي. وأشكر كلية العلوم بالأخص الدكتور عبد عون الغانمي لإكمال التحليلات الاحصائية ، والدكتور علي كاظم ، والأستاذ ليث طه ، لإتمام الجزء العملي، ولا يسعني إلا إن اشكر اخوتي و زملائي في الدراسات العليا محمد فخري، ثناء عبد الساده، رائد حامد، ضحى قاسم، نبراس كريم، دعاء علي ، أماني، عذراء ، ميثم ناصر ، حيدر المظفر، وكل طلاب الدفعة لما قدموه من دعم معنوي متمنية لهم المزيد من النجاح و التقدم ، وأخيرا أتقدم بعظيم الشكر والامتنان إلى كل من سار معي بـقدم أو خط لي بقلم او فاه لي بفم ، لا أستثني أحداً أثاب الله الجميع لإتمام هذه الرسالة .

الباحثة

نادية نايف حسين...

الإهداء

إلى الذي لا معبود بحق الا هو سبحانه وتعالى عالم الغيب
والشهادة إخلاصاً وخوفاً

إلى من بذكرهم أستنير وبهم أستجير وأسألهم الشفاعة عند
العلي القدير محمد وآله الطيبين الطاهرين

إلى وطني الجريح العراق

إلى من رووا الأرض بدمائهم وأصبحوا رمزاً للتحدي والصمود ...
شهداء العراق الأبرار

إلى من يعود لهما كل الفضل في وصولي الى هنا ..حبيباً قلبي
ونوره أبي الغالي...امي الحبيبة

إلى رفيق دربي زوجي الحبيب أحمد.....

إلى أحبتي وسندي أخواتي وإخوتي.....

إلى بهجة قلبي وفرحه يوسف و

زهراء.....

إلى كل من يحب نصرت المظلوم

والضعيف.....

إلى كل من يقدر العلم

والعلماء.....

نادية...

المستخلص :

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص الفطر *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary بالاعتماد على الصفات المظهرية والمجهرية ، وجزئياً بتقانة Polymerase chain reaction باستخدام البادئ 18S rRNA gene وتحديد الجين oxaloacetate acetylhydrolase المسؤول عن إنتاج حامض الأوكزاليك Oxalic acid gene في الفطر . تم اكنثار الفطر باستخدام وسط حبوب الحنطة Wheat grain medium للحصول على اكبر كمية ممكنة من الاجسام الحجرية لإجراء التجارب اللاحقة، وتم دراسة تأثير بعض الظروف البيئية من درجات الحرارة ، والإضاءة والظلام في إنتاج التراكيب التكاثرية الجنسية Apothecium للفطر *Sclerotinia sclerotiorum* .

تم دراسة أبعاد الأجسام الحجرية ومعامل الارتباط بين طولها ، وعرضها ، ونتاجيتها للأجسام الثمرية Apothecium ، والأكياس البوغية Ascus ، والأبواغ الكيسية Ascospores ، فضلاً عن نمط توزيع الأجسام الحجرية Pattern of Sclerotia Distribution على وسط آكار سكرورز مستخلص البطاطا PSA.

في دراسة تأثير ملح كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 100ملي مكافئ / لتر في انبات الابواغ ، ونموها الخضري ، ونتاجها للأجسام الحجرية على وسط PSA .

كما أثرت العوامل البيئية المتمثلة بدرجات الحرارة 10، 15، 20، 25⁰م والإضاءة أو الظلام . في إنتاج السويقات Stipes والأجسام الثمرية Apothecium من الجسم الحجري، فكانت درجات الحرارة 10 و15 و20⁰م مناسبة لإنتاج الأجسام الثمرية شرط توفر الإضاءة والإفان الأجسام الثمرية لم يكتمل نموها وتبقى بشكل سويق stipe يستطيل في ظروف الظلام، أما درجة الحرارة 25⁰م لم تنتج اجسام ثمرية حتى بوجود الإضاءة ، ولم يحصل نمو للسويقات عند هذه الدرجة .

وجد ان هناك ارتباط معنوي بين عرض الجسم الحجري وعدد السويقات وبين مساحة الجسم الحجري و عدد السويقات وكذلك بين مساحة الجسم الحجري و قطر الأجسام الثمرية ، ولم يكن هنالك ارتباط بين طول او عرض الجسم الحجري ، وطول وعرض الاكياس او طول وعرض الابواغ الكيسية، مما يؤكد اعتمادها في التصنيف المظهري والمجهري للفطر، حيث بلغت أبعاد الجسم الحجري 6-24 ملم طويلاً و1-12 ملم عرضاً، ومعدل عدد السويقات 3-26 وطولها 6-15 وعدد الأجسام الثمرية 2-26 وقطرها 2-6 ملم، وطول الكيس بلغ 15-31 وعرضه 2-13 مايكرون، وطول البوغ 3-7 وعرضه 2-5 مايكرون.

اختلف عدد الاجسام الحجرية المنتجة من بوغ مفرد وتفوقت في عددها عن حالة وجود اكثر من بوغ في الطبقة ففي حالة بوغ واحد أعطى معدل للأجسام الحجرية 7.1 وفي حالة بوغين وثلاثة وأربعة وخمسة 4.4، 3.9، 5.7، 5.4 على التوالي ، كذلك ارتبطت مع نمط توزيع تلك الاجسام في الطبقة. وسجلت ظهور حالة عدم التوافق في حالة زراعة اكثر من بوغ في الطبقة ، وذلك عند تكون منطقة فاصلة متمثلة بنمو ابيض كثيف من الغزل الفطري يعلو سطح الوسط .

اظهرت النتائج ان هنالك تذبذب في النمو الخضري للفطر بوجود تراكيز ملحية مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم NaCl وخاصة في الساعات الاولى من الحضن ، وتبين الانخفاض في معدل النمو في التركيز الذي يمثل 100 ملي مكافئ /لتر وهو تركيز العتبة ، في حين اعطى تركيز الربع وتركيز الضعف معدل نمو اعلى ، وعد هذا نوع من المقاومة ، كما ان وجود التراكيز الملحية المختلفة أدت إلى إنتاج أعداد أقل من الأجسام الحجرية مما في الماء المقطر المعقم واختلفت معنويًا ، ففي الماء المقطر بلغ معدل عدد الأجسام الحجرية 9.35 وأعطت التراكيز 0.145، 0.580، 1.160 أجسام حجرية بلغت 2.50، 3.80، 3.45 على التوالي .

قائمة المحتويات

ص	الموضوع	ت
أ	الخلاصة العربية.	
I	قائمة المحتويات.	
III	قائمة الجداول.	
IV	قائمة الاشكال.	
1	الفصل الأول : المقدمة .	1
3	الفصل الثاني : استعراض المراجع .	2
3	فطر الـ <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	1-2
4	تصنيف الفطر.	2-2
4	تشخيص الفطر جزيئيا بتقانة الـ PCR.	3-2
5	وبائية الفطر ودورة حياته.	4-2
7	انتاج الأجسام الحجرية ومدة احتفاظها بحيويتها.	1-4-2
9	انتاج الأجسام الثمرية والأبواغ الكيسية.	2-4-2
10	انتاج حامض الأوكزاليك ودوره في الإصابة.	3-4-2
12	بعض العوامل المؤثرة في نمو الفطر وأجسامه الحجرية والثرمية.	5-2
14	الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل .	3
14	الأجهزة والمواد المستعملة.	1-3
16	الأوساط الزرعوية المستعملة.	2-3
16	وسط اكار سكروز مستخلص البطاطا (PSA) Potato sucrose Agar.	1-2-3
16	وسط اكار دكستروز مستخلص البطاطا الجاهز (PDA) Potato Dextrose Agar.	2-2-3
16	وسط حبوب الحنطة Wheat grain media.	3-2-3

17	الماء المقطر المعقم.	4-2-3
17	الصبغات والمحاليل المستخدمة .	3-3
17	صبغة اللاكتوفينول أزرق المثيلين Lactophenol cotton blue stain.	1-3-3
17	محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH Solution.	2-3-3
17	محلول حامض الهيدروكلوريك HCl 10 عياري .	3-3-3
17	البيادئات primers.	4-3
18	العُدد Kits .	5-3
19	طرائق العمل Methods.	6-3
19	جمع العينات Samples collection.	1-6-3
20	تنمية الأجسام الحجرية للفطر S. sclerotiorum .	2-6-3
20	تشخيص الفطر.	7-3
20	التشخيص المظهري للفطر S. Sclerotiorum .	1-7-3
20	التشخيص باستخدام فحص PCR.	2-7-3
21	استخلاص الحامض النووي من الفطر Fungus DNA extraction .	1-2-7-3
22	فحص الحامض النووي المستخلص DNA profile.	2-2-7-3
22	تحضير مكونات تفاعل البوليميز المتسلسل PCR Components.	3-2-7-3
23	ظروف الدورات الحرارية لفحص PCR Thermocycler conditions.	4-2-7-3
24	تحليل نتائج فحص ال PCR.	5-2-7-3
25	تأثير بعض الظروف البيئية في إنتاج الأجسام الثمرية من الجسم الحجري للفطر S.sclerotiorum في الماء المقطر المعقم.	8-3
25	تأثير الإضاءة المستمرة في إنتاج الأجسام الثمرية من الجسم الحجري للفطر S.sclerotiorum.	1-8-3
25	تأثير الظلام المستمر في إنتاج الأجسام الثمرية من الجسم الحجري للفطر S.sclerotiorum.	2-8-3

25	دراسة بعض معايير النمو للأجسام الثمرية وعلاقتها بالجسم الحجري المتكونة منه.	9-3
27	دراسة نمط توزيع الأجسام الحجرية .Pattern of sclerotia distribution	10-3
27	طريقة الحصول على أبواغ مفردة single spore method.	1-10-3
27	زراعة الأبواغ المفردة للحصول على نمط توزيع الأجسام الحجرية.	2-10-3
28	دراسة تأثير تراكيز ملحية مختلفة في نمو الفطر وتكوين الأجسام الحجرية.	11-3
29	النتائج والمناقشة .	4
29	تشخيص الفطر مظهريا ووراثيا.	1-4
32	تأثير بعض الظروف البيئية في إنتاج الأجسام الثمرية من الجسم الحجري للفطر S. sclerotiorum في الماء المقطر.	2-4
32	تأثير درجات حرارية مختلفة مع إضاءة مستمرة.	1-2-4
34	تأثير درجات حرارية مختلفة مع ظلام مستمر.	2-2-4
37	دراسة بعض معايير النمو للأجسام الثمرية وعلاقته بالجسم الحجري المتكونة منه .	3-4
41	زراعة الأبواغ المفردة وعلاقتها بعدد ونمط توزيع الأجسام الحجرية.	4-4
44	دراسة تأثير تراكيز ملحية مختلفة من NaCl في نمو الفطر خلال 48 ساعة وتكوين الأجسام الحجرية بعد عشرة ايام من الحضان بدرجة حرارة 20+2 م ⁰ .	5- 4
47	الاستنتاجات و التوصيات.	
48	المصادر العربية.	
50	المصادر الاجنبية.	
	الملاحق.	
A	الخلاصة الانكليزية.	

قائمة الجداول

ص	العنوان	ت
14	الأجهزة والمعدات المخبرية التي استخدمت في الدراسة مع اسم الشركة وبلد المنشأ .	1
15	المواد الكيميائية التي استخدمت في الدراسة مع اسم الشركة وبلد المنشأ .	2
16	الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة مع اسم الشركة وبلد المنشأ.	3
18	يمثل البادئات التي استخدمت في هذا الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي وناتج فحص PCR.	4
19	العدد التي استخدمت في الدراسة مع اسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ.	5
23	يوضح مكونات تفاعل البوليميز المتسلسل PCR Components.	6
24	ظروف الدورات الحرارية لفحص PCR Thermocycler conditions.	7
33	يوضح تطور وتكوين الجسم الثمري في درجات حرارة مختلفة وتحت ظروف الإضاءة المستمرة بالماء المقطر المعقم.	8
36	تطور سويقات الجسم الثمري للفطر <i>S.sclerotiorum</i> عند درجات حرارة (10، 15، 20، 25) وتحت ظروف الظلام المستمر بالماء المقطر المعقم وخلال مدة حضانة 8 أسابيع.	9
38	معامل الارتباط بين طول وعرض الجسم الحجري(ملم) وكل من عدد السويقات ، وطول السويقات(ملم) وعدد الأجسام الثمرية وقطر الأجسام الثمرية(ملم).	10
40	معامل الارتباط بين طول وعرض الجسم الحجري(ملم) وكل من طول وعرض البوغ (مايكرومتر) وعدد الابواغ .	11
42	العلاقة بين عدد الأبواغ المزروعة على وسط PSA بدرجة حرارة 20 °م وعدد الاجسام الحجرية المنتجة بعد عشرة ايام من الزراعة.	12

44	تأثير التراكيز الملحية من NaCl ومدة الحضان في النمو الخضري للأبواغ المفردة للفطر <i>S.sclerotiorum</i> .	13
45	تأثير تراكيز ملحية مختلفة في معدل عدد الأجسام الحجرية في طبق قطر 9 سم على وسط PSA.	14

قائمة الاشكال

ص	الموضوع	ت
29	الأعراض المرضية لمرض العفن الأبيض على الباذنجان الذي يسببه الفطر <i>S.sclerotiorum</i> ، ويظهر عليه 1: الغزل الفطري، 2: الجسم الحجري.	1
30	الغزل الفطري للفطر <i>S.sclerotiorum</i> مع مراحل تكون الاجسام الحجرية على وسط الـ PSA بدرجة حرارة 20 + 2 خلال مدة حضان اسبوعين ، تظهر فيه اختلاف عدد الاجسام الحجرية واختلاف اقطارها واختلاف نمط توزيعها.	2
31	الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الأكروروز والذي يظهر نتائج فحص الـ PCR لجين ITS1 region ، 18S rRNA gene ، والخاص بتشخيص فطر <i>S.sclerotiorum</i> حيث يمثل (M: Marker (1500-100bp) الحفر من (1-10) عزلات الفطر الموجبة للفحص بنتائج 399bp.	3
32	الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الأكروروز ، والذي يظهر نتائج فحص الـ PCR لجين oxaloacetate acetylhydrolase والخاص بإنتاج حامض Oxalic acid في عزلة فطر الـ <i>S.sclerotiorum</i> . حيث يمثل M: Marker (1500-100bp) ، الحفر من (1-10) عزلات الفطر الموجبة للفحص بنتائج 128bp.	4
34	الاجسام الحجرية للفطر <i>S.sclerotiorum</i> وبأحجامها المختلفة بعد ثمانية اسابيع من الحضان بالماء المقطر المعقم بدرجة حرارة 10، 15، 20 ° م واضاءة مستمرة منتجة للأجسام الثمرية المكونة من 1-السويق 2- الجسم الثمري .	5
37	الاجسام الحجرية للفطر <i>S.sclerotiorum</i> وبأحجامها المختلفة بعد 8 اسابيع من	6

	الحضن بالماء المقطر المعقم بدرجة حرارة 10، 15، 20 °م وظلام مستمر منتجة للسويقات Stipes فقط.	
41	مقطع عرضي في الجسم الثمري للفطر <i>S. sclerotiorum</i> يبين 1- الأكياس البوغية 2 -الأبواغ الكيسية 3- الشعيرات العقيمة في الماء المقطر المعقم بدرجة حرارة 10، 15، 20 °م وإضاءة مستمرة بقوة تكبير 40× بعد مدة حضانة 8 أسابيع.	7
43	العلاقة بين عدد الأبواغ المزروعة على وسط PSA بدرجة حرارة 20 °م وعدد ونمط توزيع الاجسام الحجرية المنتجة بعد عشرة ايام من الزراعة : 1-زراعة بوغ واحد 2- زراعة بوغين 3- زراعة ثلاثة ابواغ 4- زراعة اربعة ابواغ 5- زراعة خمسة ابواغ.	8
46	تأثير تراكيز ملح كلوريد الصوديوم NaCl في انتاج الاجسام الحجرية للفطر <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> بعد عشرة ايام من الحضن بدرجة حرارة 20 °م.	9

ملحق 1: معامل الارتباط بين طول و عرض الجسم الحجري (ملم) وكل من عدد السويقات (ملم) وطول السويقات (ملم) وعدد الأجسام الثمرية وقطر الأجسام الثمرية (ملم) ل 30 جسم حجري.

ت	طول الجسم الحجري (ملم)	عرض الجسم الحجري (ملم)	معدل عدد السويقات	معدل طول السويقات (ملم)	معدل عدد الأجسام الثمرية	معدل قطر (ملم) الأجسام الثمرية
1	15	1	5	15	5	3.8
2	11	7	5	8.8	2	5
3	15	10	6	6.6	2	4.5
4	9	8	6	9.3	3	2.7
5	10	7	5	8.2	3	3
6	15	10	15	14.0	9	4.4
7	10	6	3	15.7	3	3.3
8	8	5	8	9.8	2	6.0
9	7	3	9	10.4	3	4.3
10	10	6	10	11.4	4	5.3
11	10	8	10	8.6	8	6.4
12	18	4	9	7.9	5	4.4
13	12	7	3	13.3	3	6
14	10	9	4	13	4	5.3
15	20	10	26	12.7	26	2.9
16	11	8	9.6	9.6	11	4.1
17	24	8	17	14.5	17	6.1
18	10	9	4	12.5	3	4.7
19	8	6	10	9.7	10	3.0
20	9	6	7	8.9	3	3.7
21	6	4	9	9.6	9	2.8
22	8	8	11	11.6	10	2.5
23	10	8	20	9.7	18	2.4
24	6	6	6	12.8	5	3.6
25	9	5	8	14	8	3.0
26	14	5	11	11.8	11	3.0
27	8	6	16	12.1	12	3.2
28	9	6	6	10.2	5	2.8
29	10	8	14	12.3	12	2
30	22	12	18	15.2	15	2.9

ملحق 2: يوضح معامل الارتباط بين طول و عرض الجسم الحجري (ملم) وكل من طول و عرض الكيس وطول و عرض البوغ (مايكروميتر) ل 30 جسم حجري.

ت	طول الجسم الحجري (ملم)	عرض الجسم الحجري (ملم)	طول الكيس	عرض الكيس	طول البوغ	عرض البوغ
مايكروميتر						
1	15	1	20	3	4	3
2	11	7	31	3	5	2
3	15	10	15	3	4	2
4	9	8	22	2.5	4	2
5	10	7	20	3	4	2

2	3	2	20	10	15	6
2	3	2.5	20	6	10	7
2	3	3	15	5	8	8
3	4	2	20	3e	7	9
3	4	2	19	6	10	10
2	3	3	18	8	10	11
2	4	3	20	4	18	12
2	5	2.5	21	7	12	13
2	4	3	15	9	10	14
2	4	2	18	10	20	15
2	3	3	20	8	11	16
3	5	3	20	8	24	17
5	6	3	19	9	10	18
3	5	3	21	6	8	19
4	7	3	21	6	9	20
4	5	3	19	4	6	21
3	5	2.5	18	8	8	22
2	3	2	19	8	10	23
2	4	3	15	6	6	24
2	4	3	24	5	9	25
3	4	2	15	5	14	26
2	5	3	20	6	8	27
2	3	13	17	6	9	28
2	4	2	22	8	10	29
3	4	2	20	12	22	30

الفصل الاول المقدمة

الفطر *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de bary من فطريات التربة الممرضة للنبات والمنتجة للأجسام الحجرية *Sclerotia* (Ayers و Adams، 1979). تعد الأجسام الحجرية وسيلة فعالة في بقاء الفطر لسنوات عدة قد تصل إلى ثمان سنوات بظروف المختبر (محمد، 2012)، وتكون مقاومة للحرارة والجفاف والمبيدات الفطرية، ويمكن أن تبقى في التربة لسنوات عديدة قد تصل إلى أكثر من عشر سنوات (Melo وآخرون، 2011). بوجود مياه الري والمناخ الدافئ (Quentin، 2004 و Rollins و Dickman، 2001). كما تتحمل مديات حرارية عالية قد تصل إلى 121⁰م (Lanoiselet وجماعته، 2005).

يسبب الفطر العديد من الأمراض النباتية على مدى واسع من المحاصيل الحقلية، والفاكهة، ونباتات الزينة، والأشجار، والشجيرات، والأعشاب الضارة (Saharan و Mehta و Garg، 2008). ويحدث مرض العفن الأبيض Whit Mould بانبات الأجسام الحجرية Carpogenically لإنتاج الأجسام الثمرية Apothecium التي تطلق الأبواغ الكيسية Ascospores في الهواء، والتي بإمكانها إصابة أجزاء النبات فوق سطح التربة (Bardin و Huang، 2001)، وتعد الأبواغ الكيسية أحد مصادر الإصابة الأولية (Roseann و Winton، 2006)، أو بالنمو الخضري Myceliogenically، حيث تنبت عن الأجسام الحجرية إلى خيوط فطرية تستطيع مهاجمة أنسجة النبات العائل مباشرة تحت سطح التربة، وبإمكان هذا الفطر أن يغزوا المحاصيل النباتية في الحقل أو المحاصيل المخزنة بعد الحصاد (Matheron و Porchas، 2005). وجد Dohroo و Cuong (2006)، أن وسط مستخلص البطاطا دكستروز اكار (PDA) والـ pH 5.0 ودرجة حرارة 20-25⁰م هي الأمثل للنمو الخضري للفطر. إذ يلعب نوع الوسط الزراعي والـ pH مع درجة الحرارة دورا في النمو الخضري، بينما درجة الحرارة 10-20⁰م هي المناسبة للإنبات الجنسي للأجسام الحجرية (Mila و Yang، 2008)، بينما سجلت درجة الحرارة 4⁰م الدرجة المثلى للإنبات الجنسي تحت ظروف المختبر (محمد، 2001). تبين أن هناك علاقة وثيقة بين درجة الحرارة والرطوبة في الإنبات الجنسي للأجسام الحجرية (Sun و Yang، 2000)، كما وإن قدرة الأبواغ الكيسية في البقاء حية لمدة 21 أسبوعا في درجات حرارة 5-10⁰م ورطوبة نسبية أكثر من 80% في المختبر، وتنخفض تلك القدرة بارتفاع درجات الحرارة (Clarkson وآخرون، 2003).

وجد إن انطلاق الأبواغ الكيسية ascospores من الأجسام الثمرية Apothecium لا يقتصر على فترات الظلام أو الضوء المستمر أو بالتناوب (Clarkson وآخرون، 2003). إن حدوث ظاهرة "النفخ" أو السحابة puffing للأبواغ الكيسية ascospores تحدث نتيجة للتغير المفاجئ للظروف البيئية مثل الإضاءة بعد الظلام أو انخفاض في الرطوبة أو الحرارة أو نتيجة لإزالة غطاء الطبقة الحاوي على الأجسام الثمرية Apothecium للفطر *Sclerotinia sclerotiorum* (Raynal، 1990 و Ingold، 1971).

اثبتت الدراسات ومنها التي قام بها Malvarez وآخرون (2007)، أن الأنواع التابعة لجنس *S.sclerotiorum* متقاربة من حيث الشكل المظهري ويمكن أن يميز بينها باستخدام صفات تشخيصية دقيقة أو عن طريق تحليل المادة الوراثية الـ DNA لذا إتجهت الدراسات في الآونة الأخيرة إلى التشخيص الجزيئي، والذي يستند الى تقنية Polymerase Chain reaction (PCR) والتي تتميز بسرعتها في اعطاء النتائج ودقتها المتناهية في التشخيص (Noonan وآخرون، 1996 و محمد والمظفر، 2013) وهي تقنية سريعة ولها درجة عالية من الدقة والحساسية. في فحص الـ PCR يمكن التمييز بين أنواع *Sclerotinia* و الفطريات الأخرى (Qin وآخرون، 2011). نظرا لأهمية الأبواغ الكيسية Ascospore في الإصابة الأولية ولقلة الدراسات الفسلجية المتوفرة عن الفطر فهذفت الدراسة إلى:

- 1- عزل وتشخيص الفطر *S.sclerotiorum* مظهريا وجزينيا والكشف عن الجين المسؤول عن إنتاج حامض الأوكزاليك oxalic acid باستخدام تقانة الـPCR.
- 2- دراسة تأثير تراكيز من NaCl في النمو الخضري للفطر وإنتاج الأجسام الحجرية وإيجاد أبعاد الجسم الحجري وعدد السويقات وطولها وعدد الأجسام الثمرية وقطرها.
- 3- دراسة نمط توزيع الأجسام الحجرية Pattern of Sclerotia distribtion على وسط PSA.

الفصل الثاني استعراض المراجع

1-2: فطر الـ *Sclerotinia sclerotiorum*:

من الفطريات الخيطية، الكيسية، الإختيارية التطفل، يتميز بتغذيته Necrotrophic , فهو يؤثر في نوعية المحاصيل وإنتاجيتها (Harel وآخرون، 2006). يعد من فطريات التربة soilborne الممرضة والمنتجة للأجسام الحجرية sclerotia، ويهاجم هذا الفطر النبات بأطواره جميعها فهو يصيب البادرات والنباتات البالغة، ويصيب جميع اجزاء النبات سواء اكان في الحقل او عند الخزن، كما يسبب العديد من الأمراض المهلكة للنبات، تظهر الأعراض المبكرة والشائعة على شكل نمو عفن أبيض زغبي على الأجزاء النباتية المصابة وسرعان ما تتطور إلى أجسام حجرية متماسكة بيضاء اللون في البداية ثم تصبح سود صلبة ذات أشكال وأحجام مختلفة ومعظمها ذو شكل مسطح أو متطاوول ونادراً ما تكون كروية (Agrios، 1997).

يتميز الفطر *S. sclerotiorum* بتكوينه غزلاً فطرياً، مقسماً، متفرعاً ومتعدد النوى على النبات العائل والأوساط الزرعوية، تتغير ألوان مستعمراته من الأبيض الى اللون الداكن، كما يكون اجساماً حجرية Sclerotia خلال الطور الخضري (Kirk وآخرون، 2001). ينتج الفطر *S. sclerotiorum* صبغة الميلانين بشكل مركب Dihydroxynaphthalene (DHN)، والطبقة الداخلية للجسم الحجري مطمورة في حشوة ليفية مؤلفة من الكربوهيدرات و البيبتاكلوكانيز والبروتينات (Michael وآخرون، 2009).

يبقى الفطر لفترات طويلة في التربة تصل إلى عدة سنوات على هيئة أجسام حجرية sclerotia وتعد هذه الأجسام الوسيلة الرئيسية التي يمكن الفطر بواسطتها من البقاء من موسم لآخر مقاوماً للظروف البيئية القاسية و الحفاظ على حيويته (محمد، 2013) وبين Steadman وآخرون، (2011) أن عملية تكوين الأجسام الحجرية هي أهم آلية لبقاء الفطر حياً، وعند الإنبات الخضري لهذه الأجسام يتكون غزلاً فطرياً يدعى (myceliogenic germination Abd-Elmagid، 2012)، أو تتكون أجسام ثمرية من نوع Apothecia تحمل الأبواغ الكيسية داخل أكياس ضمن الجسم الثمري تدعى carpogenic germination ولها القابلية على أحداث الإصابة و العدوى (Peltier وآخرون، 2012). يتكاثر الفطر جنسياً عن طريق الإنبات الجنسي للأجسام الحجرية عن طريق الإخصاب الذاتي self-fertilization، يؤدي إلى تكوين الجسم الثمري apothecia والأبواغ الكيسية ascospores داخل الأكياس Ascus، والتي تنطلق في الهواء، أو يتكاثر لا جنسياً من خلال النمو الخضري للأجسام الحجرية sclerotia (Steadman، 1983). ينتج الفطر حامض الأوكزاليك والعديد من الانزيمات التي تفتت وتحطم الأنسجة النباتية (Marciano وآخرون، 1983 و Godoy وآخرون، 1990).

2-2- تصنيف الفطر:

يعود الفطر *S. sclerotiorum* إلى مملكة الفطريات Fungi وشعبة الفطريات الكيسية Ascomycota وضمن صنف الفطريات القرصية Discomycetes وإلى رتبة Helotiales وعائلة Sclerotiniaceae و جنس *Sclerotia* (Nasser و Petrofeza، 2012).

ذكر حناوي، (1986) ان العلماء اختلفوا في تصنيف الفطر *S. sclerotiorum* فقديما عد Liebert أول من وصف جنس *Peziza sclerotiorum* عام 1837م، إلا إن العالم Fuckel (1870)، غير إسمه إلى *Sclerotinia* متضمنا خمسة أنواع هي :-

S. fuckeliana (deBary) fuckel, *S. candolleneana* (lev) fuckel, *S. tuberosa* (Hedwig) Fuckel, *S. libertiana*. Fuckel, *S. baccata* Fuckel

ذكر نفس المصدر (حناوي، 1986) ان De bary (1884) دمج جميع الأنواع التي اقترحها Fuckel بنوع واحد وأعطى لها إسم *Sclerotinia sclerotiorum* De Bary ثم اقترح كل من

Whetzelinia sclerotiorum (Lib) Korf (1972) تغير اسم هذا الفطر ليصبح *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) Korf & Dumont، إلا إن كثيرا من الباحثين لم يوافقوا على هذه التسمية وعدت التسمية التي اقترحها De bary هي الأساس لذا تم رفض اسم الجنس *Whetzelinia* وقبول اسم الجنس الحالي *Sclerotinia* ليصبح الاسم العلمي للفطر *S.sclerotiorum* (Smith، 2004، Bashi و2011، Hoyte و2012). من الأسس التي يعتمد عليها في التشخيص والتصنيف المظهري هما الطورين الجنسي و اللاجنسي (Webster و Weber، 2007). فضلاً عن الخصائص المظهرية العامة، والأجسام الحجرية، كما توجد عدة اختلافات لا يمكن تحديدها بالإعتماد على التشخيص المظهري، إلا إنه يمكن معرفتها عن طريق عدد من المركبات الكيميائية المنتجة من قبل الفطر كحامض الأوكزاليك، وعدد من الأنزيمات المحللة للجدران الخلوية للنبات مثلا البكتينيز Exo- Pectinase والبروتياز Protease إذ يكون بعضها شديد التأثير في بعض العوائل النباتية، وغير فعال على عوائل أخرى (Cessna وآخرون، 2000).

2-3- تشخيص الفطر *S.sclerotiorum* جزيئياً بتقانة الـ PCR:

تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase Chain Reaction (PCR هو تقنية تعتمد على دراسة الحامض النووي DNA لغرض التشخيص الدقيق وتحديد السلالة الممرضة فيها إذ تتم من خلال بعض الصفات الوراثية، فضلاً عن DNA مثل التوافق الذاتي لمجاميع الغزول الفطرية Mycelial Compatibility Groups (MCG)، كما أشار Safaie وآخرون، (2011) عن طريق دراسة عدد من عزلات الفطر شملت 38 عزلة على مستوى العشيرة population والتي تعود إلى السلالة المعروفة باسم MCG وسلاطين غير معروفة في إيران، وعن طريق دراسة الجينات للتتابعات الجينية PPB، I، h، حيث أظهرت تغييرات بين السلالات المختلفة إذ كانت النتائج متباينة $h = 0.291$, $I = 0.429$, $PPB = 75.21$ ، باستخدام تقانة Repetitive-PCR (Rep-PCR)، أن التغيرات الوراثية واضحة بين السلالات المختلفة وكذلك قد ينشأ التغيرات الوراثية ضمن السلالة الواحدة نفسها بفعل عدد من العوامل كالهجرة Immigration، والطفرة Mutation، والانتخاب التفاضلي Diversifying Selection، وكذلك من خلال التكاثر الجنسي Sexual Reproduction الذي يمكن أن يحصل مع أفراد أخرى متغايرة وراثياً (Safaie وآخرون، 2011).

يستخدم تصنيف العزلات في MCGs بشكل روتيني في العديد من المختبرات كعلامة سريعة للنوع الجيني *S. sclerotiorum* بين العشائر، ويتم تنفيذ تقرير MCG باستخدام وسط محدد وضع أصلاً لإختبار التوافق الخضري في *S. minor* وهو وسط باترسون (Patterson و Grogan، 1985) ووسط PDA (Schafer و Kohn، 2006).

في اختبار لمعرفة نسبة التوافق بين عزلات الفطر، أظهرت العزلات المتوافقة مستعمرة واحدة خالية من الحدود الفاصلة بين الأزواج interaction zone، في حين أنتجت العزلات الأخرى حدوداً واضحة تراوحت بين الخط المايسيل الرقيق في المنطقة الفاصلة إلى غزل فطري سميك في المنطقة الفاصلة بين العزلتين إلى تفاعل شديد متمثل بالنمو الفطري بشكل كثيف مع تلون المزرعة باللون الأحمر، إن إختبار MCG هو مظهري phenotypic، وفي الفحص المجهرى للنظام تمييز الذاتي التي تسيطر عليها مواضع متعددة مشتركة في الفطريات (Karimi وآخرون، 2012).

2-4- وبائية الفطر ودوره حياته:

يسبب فطر الـ *S.sclerotiorum* أمراضاً في الحقول مما يؤدي إلى حصول خسائر كبيرة لمحاصيل الخضر والنباتات المختلفة وتظهر الأعراض على نبات الباذنجان في البيوت المحمية على الأجزاء الهوائية والأرضية للنبات بهياة غزول فطرية بيض تشبه القطن تغلف السطح الخارجي والداخلي للجزء النباتي المصاب، مع تكون الأجسام الحجرية بأحجام مختلفة ذات لون أسود ويصبح لون العضو النباتي المصاب مختلف عن العضو السليم، حيث يتحول إلى اللون الأصفر أو البني وبداية حصول الذبول وانتقال المايسيليوم إلى الساق وتنتقل الإصابة إلى الأوراق مما يؤدي إلى موت النبات (حناوي، 1986).

إن الجوانب الجزيئية للأمراضية يتركز على مساهمة نشاط أنزيم التحلل المائي hydrolytic enzyme وإنتاج بعض المواد الأيضية التي بضمنها السموم وحامض الأوكزاليك، تلعب الأنزيمات المحللة للجدار الخلوي cell wall degradation enzymes (CWDEs) مثل β -1,3-

تسهيل الاختراق ، واضعاف أنسجة المضيف، (Riou وآخرون، 1991). كذلك ينتج الأنزيمات المحللة للبروتين Protease، التي تسهل من إختراق أنسجة العائل (Cessna وآخرون، 2000). ويعدّ الـpH عاملاً مهماً في نشاط الأنزيم والتعبير الجيني للأنزيمات أثناء نشوء المرض (Bueno وآخرون، 2012). كما ويصيب *S.sclerotiorum* و *S.minor* نبات الخس ؛ ويسبب مرض Lettuce drop (Borriss، 2009 و Chitrampalam وآخرون، 2010). ذكر Kobayashi و Suzui (1972)، إن هذا الفطر يصيب أيضاً محصول الفاصوليا الجافة *Phaseolus vulgaris*، وإن وجود الأجسام الحجرية في التربة بنسبة 2-3 جساماً حجريا لكل متر مربع قادرة على إحداث إصابة تصل من 60 – 90%. كما بين Letham وآخرون، (1976)، أن الفطر يظهر بصورة وبائية كل أربع سنوات في حقول الطماطة، وكل خمس سنوات في حقول القرنابيط. مؤدياً إلى إنخفاض الغلة وجودة الحاصل وبشكل ملحوظ عند وجوده على بعض المحاصيل الهامة مثل زهرة الشمس (Sunflower، Gulya، 1997 و Karimi وآخرون، 2012)، وفول الصويا (soybean، Danielson وآخرون، 2004). يسبب الفطر إنخفاض محصول البطاطا 30% في بعض مناطق المانيا (Quentin، 2004).

يستمر نشاط الفطر بتحطيم الأنسجة النباتية التي يغزوها بشكل كامل وبالأخص الأنسجة البرنكيميّة، ويبدأ بعدها ظهور الغزل الفطري والذي يتميز بلونه الأبيض White cottony، وبعدها يتحول إلى اللون البني وهو بداية لتكوين الأجسام الحجرية السود وبأعداد وأحجام مختلفة (Purdy، 1979). ويعتمد تحول الأجسام الحجرية إلى اللون الأسود تدريجياً بعد مرور فترة من النمو تطول أو تقصر هذه الفترة اعتماداً على توفر الغذاء والعوامل البيئية المحيطة (Saharan و Mehta، 2008).

إن الأعراض الناجمة عن السكليروتينا تختلف إلى حد ما باختلاف النبات أو الجزء النباتي المصاب، ومع الظروف البيئية، فالأعراض المبكرة النموذجية هو ظهور اللون البني، مع عفن رطب، وكثيراً ما يكون مصحوباً بنمو كتل بيضاء من نموات الفطر، وخصوصاً خلال الطقس الرطب، أما في الظروف الجافة، تصبح الإصابات جافة وهشة وبيضاء اللون، وفي النهاية تتشكل الأجسام الحجرية السود على أوفي الأنسجة المصابة، وتختلف هذه الأجسام في الحجم والشكل اعتماداً على أنسجة المضيف المصابة ففي المراحل المبكرة من العدوى، تذبل أوراق النبات، وقد يموت النبات، وفي بعض الحالات، قد تبدأ العدوى في ورقة أو زهرة ومن ثم الانتقال إلى الساق (Olsen وآخرون، 2003 و Peltier وآخرون، 2012).

يتميز العفن السكليروتيني على الخيار، الكرّفس، والبنجر بانهيار مفاجئ وموت في الأوراق والأعناق كما يصيب الفطر قاعدة الساق، ثم يغزو الأعضاء بسرعة وينتشر من خلال الساق، تذبل النباتات وتموت. عادة ما يظهر المايسيليوم والأجسام الحجرية على السطح السفلي من الأوراق الخارجية، ولكن تحت الظروف الرطبة فإن الفطر يغزو النبات تماماً ويؤدي إلى التعفن، مما ينتج عنه نمو أبيض، رقيق على النبات بأكمله، يكون الفطر في نهاية الشتاء خيوطاً فطرية في النباتات الميتة أو الحية، وأجسام حجرية على أو داخل الأنسجة المصابة، والأجسام الساقطة على الأرض حيث تنبت في الربيع أو أوائل الصيف (Saharan و Mehta، 2008).

تنبت الاجسام الحجرية ويكون إنباتها إما إنباتاً جنسياً Carpogenic Germination إذ يبدأ بتكوين السويق Stipe، والذي ينمو ليعطي الجسم الثمري Apothecium التي تحتوي على الأبواغ الكيسية Ascospores، والتي تنتشر على العائل لتحدث الإصابة من جديد وتعيد دورة حياة الفطر، وتعد أحد مصادر الإصابة الأولية، (Ulrich و Eisenbach، 2000)، أو قد يكون إنبات الأجسام الحجرية إنباتاً خضرياً لتعطي غزولاً فطرية بشكل مباشر (Amselem وآخرون، 2011). تنبت الأبواغ الكيسية عند توفر الظروف الملائمة لتعطي غزولاً فطرية Mycelium ذات لون أبيض تقضي فصل الشتاء البارد على سطح النبات العائل كطور خضري للفطر ثم ما يلبث أن يتحول إلى أجسام حجرية عند نهاية فصل النمو إذ تبقى هذه الأجسام في التربة لحين إنباتها من جديد في موسم النمو التالي. وتعدّ الابواغ إحدى

وسائل إنتشار الفطر من حقل إلى آخر عن طريق الرياح، و ينتقل الفطر بفعل الأجسام الحجرية الموجودة في التربة الملتصقة بالبادرات و المعدات الزراعية الملوثة (Agrios، 1997).

2-4-1- إنتاج الأجسام الحجرية ومدة احتفاظها بحيويتها:

الأجسام الحجرية هي : عبارة عن تراكيب سوداء صلبة متعددة الغزول الفطرية **Multihyphal Structure** مختلفة في النوع والحجم والشكل من جنس لآخر ، ومن نوع لآخر ضمن الجنس نفسه تلعب دورا مهماً في بقاء الفطر وإنتشاره (Rollins و Dickman، 2001) .

ذكر Le Tourneau (1979)، إن التحليل الكيميائي للأجسام الحجرية أظهر إحتوائها على دهون، بروتين، كربوهيدرات، أحماض أمينية، أحماض دهنية ورماد، كما أكد على وجود كميات كبيرة من الكربوهيدرات في الكتلة الجافة من الجسم الحجري الناضج علاوة على الكايتين، و الكلايكوجين، و التريهالوز، و المانيتول، والكلوكوز، والفركتوز أما بقية الكربوهيدرات فإن وجودها يعتمد على مصدر الكربون في الوسط الغذائي.

تنتقل الأجسام الحجرية بواسطة التربة، مياه الري، البذور، أدوات الزراعة، الأسمدة العضوية، والمواد النباتية المخزونة، ولأن الفطر ينتج اجساما حجرية كثيرة تنتشر لمسافات بعيدة، فضلاً عن عدم جدوى الدورة الزراعية القصيرة في المكافحة وقلة عدد المبيدات الكيميائية الفعالة ضد الفطر الساكن في التربة، وقد تكون المكافحة الكيميائية غير إقتصادية في المساحات الواسعة، فضلاً عن أن إستخدامها يحدث خللاً في التوازن الحي في التربة وسيؤدي إلى تلوث التربة والمياه الجوفية بالمبيدات المستخدمة، لذلك تعتمد مكافحة هذا الفطر حالياً على أسلوب المكافحة المتكاملة، على سبيل المثال الجمع بين المبيدات الكيميائية الصديقة للبيئة والعمليات الزراعية يقلل من تطور الفطر الممرض وإنتشاره على بعض المحاصيل (Dillard وآخرون، 1995). وكذلك بإستخدام البسترة الشمسية لمدة إسبوعين تقلل من كمية اللقاح في التربة (محمد والونداوي، 2004).

تعد الأجسام الحجرية من أهم وسائل البقاء في الفطريات من خلال قدرتها على تحمل الظروف غير الملائمة، فضلاً عن قدرتها على النمو حتى بعد مرور مدة طويلة على بقائها في التربة (Melo وآخرون، 2011).

هناك ثلاثة أنواع من الأجسام الحجرية الخاصة بالفطر *S. sclerotiorum* ، وهي النوع الطبيعي وغير الطبيعي والنوع البني ، إن الأنواع غير الطبيعية تكون قد تكونت نتيجة للعوامل الفسلجية وليس نتيجة للعوامل الوراثية، أما النوع الثالث فهو الجسم الحجري البني الذي يتم إنتاجه من سلالات نادرة جدا من الفطر *S. sclerotiorum* وتم جمع هذه الأجسام من نباتات زهرة الشمس والخس المصابة بالفطر (Yeung و Huang، 2002).

تتكون الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* من الطبقة الخارجية تسمى القشرة Cortex ذات اللون الأسود ؛ بسبب تراكم صبغة الميلانين، وهي التي تعطي الأجسام الحجرية القدرة على مقاومة الظروف البيئية غير الملائمة، وكذلك حماية الفطر من أي ضرر يؤدي إلى ضعف مقاومتها وزيادة حساسيتها تجاه الممرضات الأخرى مثل الكائنات المجهرية (Smith -Coley، 1960) فيما يكون نسبتها أقل في الطبقة التالية، والتي تعرف بالـ Rind ، أما الطبقة الداخلية اللب Medulla فهي تتكون من خلايا نسيج كاذب تخلو من صبغة الميلانين بشكل تام (Butler وآخرون، 2009). إن حامض الأسكوربيك Ascorbic Acid له دور في تمايز Differentiation الجسم الحجري وخصوصا في صبغة Ascorbat وتحت ظروف الاكسدة Oxidative Stress، إذ إن تحول الجسم الحجري من اللاتمايز إلى التمايز يكون مصحوبا بتغير حاد في بيئة عمليات الأكسدة و الأختزال الخاصة بالصبغة Ascorbat من أجل تحويلها إلى صبغة متأكسدة (Georgiou وآخرون، 2003).

الأجسام الحجرية سوداء اللون، مستديرة وغير منتظمة الشكل تبلغ ابعادها 2-15 X 5-7 ملم (Cuong و Dohroo، 2006). مع ملاحظة خروج سوائل عديمة اللون منها في أثناء تكوينها، إذ تظهر في بداية تكوين الجسم الحجري و تختفي عند إكمال تكوينه بعد بضعة أيام (سمير ونعمة ، 2013). هناك عوامل كثيرة تؤثر في حيوية الأجسام الحجرية ومقدرتها على الإنبات وأهمها الحرارة، الرطوبة، والأحياء المجهرية الموجودة في التربة ويعد محتوى التربة الحيوي من أكثر العوامل أهمية في

تحديد بقاء الجسم الحجري حيا، إذ أن بعض الأحياء المجهرية المعروفة هي مضادات أو طفيليات فطرية لأنواع الجنس *Sclerotinia* (Saharan و Mehta، 2008). وفي دراسات مختبرية لمعرفة هذه التأثيرات فقد درست كفاءة التضاد والتطفل لأنواع عديدة من الفطريات والبكتريا المعزولة من الأجسام الحجرية تصل إلى أكثر من 30 نوع (Xin Li وآخرون، 1993).

تبقى الأجسام الحجرية محتفظة بحيويتها وفعاليتها لسنوات عديدة في التربة عندما تدفن في أعماق مختلفة وتكون مقاومة للجفاف والحرارة والمبيدات الفطرية (Melo وآخرون، 2011). إذ أوضح Frate و Long (2005) وجود دراسات تؤكد بقاء بعض الأجسام الحجرية فعالة وحيوية في القناة الهضمية للأغنام. وإن قدرة الأجسام الحجرية على مقاومة الظروف البيئية القاسية مثلا لأشعة فوق البنفسجية وهجمات الأحياء الدقيقة في التربة وفي أثناء الهضم من قبل الحيوانات تعود إلى وجود العديد من طبقات الميلانين (Bashi، 2011).

والحرارة العميقة في البداية قد يقلل من حدوث المرض عن طريق إزالة الأجسام الحجرية من سطح التربة العلوي، والتي سوف تقلل من عدد *apothecia* المنتجة (Mueller وآخرون، 2002) ومع ذلك، يمكن للأجسام الحجرية البقاء حية لمدة ثلاث سنوات إذا ما دفنت بعمق 8-10 بوصة (20-25 سم) في التربة. كذلك فإن استخدام البسترة الشمسية مع سماد اليوريا يعجل من تحلل الأجسام الحجرية وزيادة الأحياء المجهرية المفيدة (محمد، 2001، و محمد والوندأوي، 2004). لوحظ أن هنالك ارتباط معنوي سالب في حيوية الأجسام الحجرية الكبيرة والصغيرة مع زيادة مدة الخزن بالسنوات في المختبر حتى وصلت الحيوية إلى 0% للأجسام الحجرية الصغيرة في السنة السابعة من الخزن، وإلى 10% للأجسام الحجرية الكبيرة في السنة الثامنة من الخزن (محمد، 2012).

2-4-2- إنتاج الأجسام الثمرية والأبواغ الكيسية:

إن النباتات الجنسي للفطر *Carpogenic* عادة ما يتطلب بقاء الأجسام الحجرية في ظروف رطبة لمدة أسبوع أو أسبوعين قبل الإنبات، ويمكن أن يحصل في أعماق التربة التي تصل إلى 2 سم عمقا، يبدأ تكوين الأجسام الثمرية *Apothecia* من النسيج الفطري في فصل الربيع وأواخر الشتاء (Webster و Weber، 2007). عن طريق تكوين نتوء صغير يبرز من سطح الجسم الحجري و الذي ينشأ أساسا من طبقة القشرة *Cortex*، أو اللب *Medulla* في الجسم الحجري، يستمر بالنمو ليكون بشكل هايفات متشابكة تحتوي المناطق الفعالة منها على سايتوبلازم كثيف مكونة ما يعرف بالسويق *Stipe* يتراوح طوله بين 5-21 ملليمتر، والذي يحمل في نهايته تركيب قمعي الشكل يدعى *Apothecium* ذو طبقة داخلية خصيبة تسمى *Hymenium Layer* وتحوي الأكياس البوغية *Asci* (Le tuorneau، 1979). إذ يمتاز هذا التركيب بأنه بني اللون دائري الشكل، ويتراوح قطره بين 2-9 ملليمتر، وإن عدد الأجسام الثمرية *Apothecium* بين 1-9 لكل جسم حجري. تكون الأكياس *Asci* عديمة اللون إسطوانية الشكل ذات أبعاد تتراوح بين 4.9 - 8.5 X 91 - 165 مايكرومتر، ويحتوي كل كيس على 8 أبواغ جنسية كيسية *Ascospores* مرتبة بشكل إهليلجي وتتراوح أبعادها بين 6.5 - 13 X 4.2 - 6.6 مايكرومتر، تبدأ الأجسام الثمرية بإطلاق الأبواغ الكيسية *Ascospore* ويكون إنطلاق الأبواغ الكيسية بشكل سحابه *Barari* (Barari وآخرون، 2010). قد تصل أعدادها إلى 10 ملايين بوغا كيسيا خلال 2-3 أسابيع تقريبا وتحمل مع الهواء، وقد تبعد مسافة 100 متر عن الأجسام الثمرية وبعض منها قد ينتقل لمسافة 3-4 كم بواسطة الرياح ضمن البيئة المحيطة بالجسم الحجري، وإن أغلب هذه الأبواغ سوف يسقط على النباتات المفضلة من قبل الفطر، كما وإن الأبواغ الكيسية تبقى محتفظة بحيويتها عند ارتفاعها لأكثر من 6000 متر بواسطة الرياح، وهذا يعد مؤشراً لإمكانية إنتشاره المسافات بعيدة (Petrofeza و Nasser، 2012). وتلتصق الأبواغ بأي جسم تسقط عليه فإن سقطت على أحد عوائلها ينمو الفطر رميا *saprophyte* وبعدها تنتقل إلى نباتات أخرى أو إلى الأجزاء السليمة لنفس النبات ويصبح الفطر متطفلا *parasitism* (Venette، 1998)، إن إنبات البوغ الكيسي يحصل بعد 4 أيام في درجة 16-22 °م، ويكون الإنبات بطئ في درجة 8-10 و 22-24 °م، كما لم يحصل إنبات في درجة أقل من 7 مئوية أو فوق درجة 26 °م في تجارب المختبر (Koch وآخرون، 2006).

تبدأ الأبواغ الكيسية بالإنبات على الأزهار والأوراق عند وجود الرطوبة العالية ودرجة حرارة 12-25 م⁰، ومع استمرار وجود الندى أو الضباب أو المطر تستمر حركة المايسيليوم من الأنسجة أو الأجزاء المصابة إلى الأنسجة أو الأجزاء السليمة العائدة للعائل النباتي مثل الساق والأوراق وغيرها، وفي وقت لاحق من تقدم المرض يتم تكوين الأجسام الحجرية أما على سطح النبات أو في داخل الساق أو غيرها من الأجزاء النباتية، وعند سقوط النبات الميت أو أجزاء ميتة من النبات المصاب بالفطر فإن الأجسام الحجرية الموجودة في النبات سوف تسقط، هي الأخرى على التربة إذ بإمكانها أن تبقى على قيد الحياة لسنوات عديدة (Olsen وآخرون، 2003 و Petrofeza و Nasser و Peltier وآخرون، 2012).

2-4-3- إنتاج حامض الأوكزاليك ودوره في الإصابة:

ينتج هذا الحامض من قبل العديد من الفطريات إذ يلعب دوراً أساسياً في إصابة النباتات بالعديد من الأمراض المهمة إقتصادياً وكلما كانت كمية الحامض المنتجة من الفطر كبيرة كلما كانت إمرضية الفطر عالية (Karlovsky، 1999). إن إنتاج الحامض يؤدي إلى خفض قيمة الـpH بشكل كبير، وهذا ما يسمح للفطر بإختراق النبات بسهولة بالغة (Micales، 1995). كما يعد حامض الأوكزاليك Oxalic Acid (OA) الذي ينتج ويفرز من الفطر *S. sclerotiorum* عاملاً أساسياً ومحدد الإراضية، إذ يقوم الفطر في أثناء إصابة للأنسجة النباتية بإفراز تراكيز عالية منه، إذ يعمل الحامض على سحب أيون الكالسيوم Ca⁺⁺ من جدار الخلية مما يؤدي إلى جعل الأجزاء البكتينية أكثر قابلية للتحلل بواسطة أنزيمات Hydrolases الفطرية، كما يعمل حامض الأوكزاليك على خفض الرقم الهيدروجيني pH في النسيج المصاب وتحويله إلى وسط حامضي لتنشيط الأنزيمات المحللة للجدار الخلوي مثل Pectolases، Cellulases، و Hemicellulases، و Phosphatidases، وأيضاً للحامض دور في عملية تحلل اللكينين عن طريق تحفيز أنزيم Mn-Peroxidase، ويعد إنتاج أنزيم Oxalate Oxidase (OXO) و Oxalate Decarboxylase و oxalyl-CoA decarboxylase، وكذلك ترسب حامض الأوكزاليك على شكل ملح ذائب أو غير ذائب في النبات كاستجابة دفاعية ضد الحامض المفرز من قبل الفطر (Caliskan، 2000 و Lu و Mei و Korag وآخرون، 2003).

يوجد حامض الأوكزاليك في معظم الكائنات الحية، كالنباتات، الحيوانات والأحياء المجهرية الدقيقة فضلاً عن الفطريات، ويحدث بناء هذا المركب في كل الأغشية الحية للمجاميع الحية، ويوجد أما بشكل حر، أو بشكل أملاح الكالسيوم، وهذه الحالة تكون الأكثر شيوعاً، أو بشكل أملاح البوتاسيوم وأحياناً الصوديوم، وتظهر الأحياء مستويات مختلفة من محتوى الأوكزالات، وحتى ما بين أنواع الجنس الواحد يعد حامض الأوكزاليك هو أحد أكثر الأحماض العضوية القوية شيوعاً إذ أن قيمة الـpH له تتراوح ما بين 1.3-4.3 (Caliskan، 2000).

وجد كل من Stotz و Guimaraes (2004) عن طريق اختبار الفرضية التي تشير إلى تأثير الأوكزالات المسبب لذبول الأوراق في النباتات المصابة بالفطر *S. Sclerotiorum*، أن الأوكزالات تغير الأوزموزية في داخل الخلايا الحارسة وكذلك تتداخل مع الهرمون النباتي Abscisic Acid المحفز لغلق الثغور. ولقد أشار Bolton وآخرون، (2006) إلى أن الفطر *S. Sclerotiorum* ينتج كميات كبيرة من حامض الأوكزاليك على الأوساط القاعدية لخفض الرقم الهيدروجيني للوسط إلى الحامضي الذي يعد ملائماً لعمل أنزيم Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) الذي يكون عمله مرافقاً لبناء الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*، كما وجد العالم Smith (2004) إن تركيز حامض الأوكزاليك المنتج من قبل الفطر *S. minor* والمتطفل على نبات فول الصويا قد تغيرت من 4.19 ملغم عند درجة حرارة 25⁰م إلى 0.022 ملغم عند درجة 30 م⁰ أي أن إنخفاض معدل إنتاج الفطر بارتفاع درجة الحرارة، ويعود هذا إلى إن القدرة الإراضية للفطر قد إنخفضت بفعل الحرارة العالية والتي هي غير ملائمة لنمو الفطر الذي يفضل المستويات المنخفضة من الحرارة وبالتالي أدى إلى خفض إنتاج الحامض. وأشار Rollins و Dickman (2001) إن ارتفاع الرقم الهيدروجيني للوسط باتجاه القاعدية يؤدي إلى تحفيز الفطر على إنتاج حامض الأوكزاليك بكميات أكبر، وهذا بدوره يؤدي إلى عودة الرقم الهيدروجيني إلى الحامضية من جديد بشكل يتناسب مع حاجة الفطر الفسيولوجية والأنزيمية.

2-5- بعض العوامل المؤثرة في نمو الفطر وأجسامه الحجرية والثمرية:

يحصل النمو للفطر شأنه شأن الأحياء الأخرى مع توفر عدة عوامل تتداخل مع بعضها بعض والمواد الأخرى كالتركيب الكيميائي ودرجه حموضة pH إذ أشار الجبوري ، (2013) إن أعلى معدل نمو للفطر كان عند الرقم الهيدروجيني 7. كما بين Shresti (2005) إلى إن انخفاض الرقم الهيدروجيني للوسط يجعل الغشاء الساييتوبلازمي متمسكا بأيونات الهيدروجين إذ تعمل على عرقلة مرور الأيونات الموجبة، أما عند ارتفاع الرقم الهيدروجيني فتعمل أيونات الهيدروجين على منع مرور الأيونات السالبة الضرورية . وأوضح Cuong و Dohroo (2006)، أن الرقم الهيدروجيني 5 هو الأمثل للنمو الخضري للفطر. أما بالنسبة إلى الجهد الأوزموزي فقد أكد حناوي، (1986) ، إن الجهد الأوزموزي الأمثل لتطور الأجسام الحجرية ونشوء الأجسام الثمرية ونتاج أكبر عدد من السويقات ، والأجسام الثمرية هو: الجهد صفر بار ، وقلت نسبة التطور وعدد السويقات والأجسام الثمرية بصورة تدريجية بزيادة الجهد الأوزموزي حتى أصبحت نسبة التطور صفر عند الجهد 9.38- . وللتراكيز الملحية تأثيرا في نمو الفطر *Sclerotium* وتكوين الأجسام الحجرية مثل ملح كلوريد الصوديوم NaCl ، حيث إن التركيز العالي من الملح 10^5 ملغم/لتر يؤدي إلى تثبيط تكوين الأجسام الحجرية للفطر، بينما لم يؤثر في نمو الغزل الفطري للفطر (Hassan و Shahzad ، 2004). ولأملاح كربونات البوتاسيوم الهيدروجينية $KHCO_3$ تأثيرا في نمو الغزل الفطري لل *Rhizoctonia solani* و *S. sclerotium* ، حيث كلما زاد تركيز الأملاح المضافة إلى الوسط يقل معدل النمو وخاصة في التراكيز العالية 75 و 100 مليمايكرون بعد فترة حضانة تصل إلى 72 ساعة ، وكذلك يمكن أن تؤثر في الفطر من خلال فعاليتها المضادة لبناء الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotium* واختزال عددها حتى عند التراكيز الأقل (Erper وآخرون، 2011). أما بالنسبة إلى الرطوبة ودرجة الحرارة، بين المظفر، (2013)، أن درجات الحرارة المناسبة للنمو تراوحت بين 10-20م⁰ بينما درجة 30 م⁰ و 35 م⁰ أثرت بشكل سلبي في نمو الفطر إذ لم يحصل النمو عندها مطلقا. كما أثرت نوعية مياه الري في إنتاج الأجسام الثمرية من الجسم الحجري (محمد، 2003a) . وشكل كلا من الضوء والإشعاعات ظروفًا غير مستقرة فهي تتغير بين فترة وأخرى لكن على العموم فإن الفطريات تكيفت للعيش ضمن مدى محدود حسب نوع الفطر أو السلالة أو حتى العزلة الواحدة متمثلة بالدرجة الصغرى (minimum) بالكاد ينمو فيها الفطر ولا ينمو بأقل منها والدرجة المثلى (optimum) ، وهي أقصى معدل للنمو والدرجة القصوى (maximum) ، والتي يتوقف بعدها النمو وهناك فطريات تتحمل درجات حراره عالية أكثر من 50 م⁰ (Maheshwari وآخرون ، 2000).

ذكر Caesar و Pearson (1983) إنخفاض قدرة الابواغ الكيسية للفطر *S. sclerotium* على البقاء في درجات الحرارة العالية . لكنها يمكن أن تبقى بحدود 21 إسبوع بدرجة 5-10 م⁰ ورطوبة نسبية أكثر من 82% في المختبر (Clarkson وآخرون، 2003).

وبالرغم من أن درجة الحرارة المناسبة للإنبات الجنسي للفطر *S. sclerotium* تكون في الغالب بين 10-20 م⁰ إلا إن درجات الحرارة اختلفت بين الدراسات المختبرية (Yang و Mila ، 2008). كما أظهرت الدراسات بأن العوامل البيئية المتمثلة بدرجة حرارة التربة ،رطوبة التربة والضوء تؤثر على تكوين الجسم الثمري للفطر (Huang و Yeung، 2002).

يعد الضوء عاملاً بيئياً مهماً له تأثير في تطور الجسم الحجري وتكوين السويقات والأجسام الثمرية للفطر *S. sclerotium* إذ إن له تأثير في الفترة اللازمة لظهور السويقات المتكونة من الجسم الحجري، حيث تظهر بعد 3 أسابيع بوجود الضوء وبعد 10 أسابيع بلغ عددها 65.5 سويق لكل 10 أجسام حجرية بينما في ظروف الظلام ظهرت السويقات بعد 12 إسبوع وعددها 107 لكل 10 أجسام حجرية بعد 20 إسبوع (Letham ، 1975). وعند تعرض السويقات للضوء تتكون الأجسام الثمرية وعند الظلام فقط تستمر بالإستطاله (Henderson، 1962، و محمد ، 2001) . إن الإضاءة المستمرة ضرورية لتطور الأجسام الحجرية وتكوين الأجسام الثمرية في ظروف المختبر ، ولم تتكون الأجسام الثمرية في ظروف الظلام المستمر (محمد، 2001 وسمير ونعمة، 2013) . كما ذكر Kosasih و Willetts (1975) إنهما لم يتمكنوا من الحصول على أي جسم ثمري عند اختبار (200) عزله من الفطر *S. sclerotium* في الظلام الكامل ،بينما حصل Letham وآخرون، (1976) على أعداد كثيرة من الأجسام الثمرية عند إختباره ل23 عزله في ظروف الإضاءة المستمرة للفطر *S. sclerotium* . بينت محمد، (2001) إن للضوء تأثيرا كبيرا في

إنبات الأجسام الحجرية وتكوين الأجسام الثمرية فلم يظهر أي إنبات جنسي في ظروف الظلام في أي من درجات الحرارة التي تتراوح بين 5-50 م⁰، لكن ظهر إنبات جنسي بين درجات الحرارة من 5-20 م⁰ في ظروف الإضاءة المستمرة فقط بشدة 650 لوكس.

الفصل الثالث

3 - 1: الأجهزة والمواد المستعملة:

الجدول 1: الأجهزة والمعدات المختبرية التي استخدمت في الدراسة مع اسم الشركة وبلد المنشأ

الشركة المصنعة (المنشأ)	الجهاز	ت
Lab Tech - Korea	Incubator	1
England-Gallenkamp	pH Meter	2
Germany -Humascope	Compound Light Microscope	3
U.S.A. -Allamerican	Autocla	4
Gallen Kaamp(England)	Sensitive electronic balance	5
S.-Lab Tech Korea	Distiller water	6
Tianjin Taisite- China	Laminar air flow	7
Bioneer/ korea	PCR Thermo Cyclor	8
Hitech	Centerfuge	9
Shndon,scientific Co.LTD/England	Gel electrophorsis	10
CYAN/ China	Micropipette 0.5-10µL, 10-100 µL, 100-1000 µL	11
Memmert (Germany)	Water bath	12
Superestar(India)	PCR Test Tube	13
-	Loop	14
Bioneer/ korea	Exispin vortex centrifuge	15
Germany	growth chamber	16
CYAN China	Vortex	17
Unisonics LTD England	Flaskes	18
San.Gabriel,USA	Ultra violet	19
Superestar(India)	Slides and cover slips	20
Sony (Japan)	Digital camera	21

Eppendorf/ Germany	Cooling Centrifuge	جهاز نبد مركزي مبرد	22
Concord (Lebanon)	Refrigerator	ثلاجة	23
Sartorius Germany	Balance	ميزان عادي	24
-	filter paper	اوراق ترشيح	25
Local morkd		قطن طبي	26
Local morkd		شاش	27

الجدول 2 : المواد الكيميائية التي استخدمت في الدراسة مع اسم الشركة وبلد المنشأ

الشركة المصنعة (المنشأ)	المادة	ت
BDH- England	Na OH هيدروكسيد الصوديوم	1
BDH- England	Na Cl كلوريد الصوديوم	2
BDH- England	HCL حامض الهيدروكلوريك	3
HIMEDIA- India	Agar-Agar أكار- أكار	4
Biobasic/ Canada	Agarose	5
Biobasic/ Canada	Ethidium bromide	6
Biobasic/ Canada	TBE buffer	7
Biobasic/ Canada	Absolute ethanol	8
Biobasic/ Canada	Isopropanol	9
Bioneer/ Korea	Free nuclease water	10
Bioneer/ Korea	Ladder 100bp	11
DH England	Formalin فورمالين	12
BDH U.K	Lactophenol صبغة أزرق المثليين cotton blue stain	13
Samara- Iraq	Chloramphenicol كلورامفينيكول	14
-	Ethanol كحول اثيلي	15
BDH U.K	هاييو كلورات الصوديوم (القاصر) Sodium hypochlorite	16

الجدول 3: الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة مع اسم الشركة وبلد المنشأ

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم الوسط الزرع	ت
-	اكار سكروز مستخلص البطاطا PSA	1
-	وسط حبوب الحنطة Wheat grain media	2
Himedia India	اكار دكستروز مستخلص البطاطا الجاهز PDA	3

3-2: الأوساط الزراعية المستعملة:-

3-2-1: وسط آكار سكروز مستخلص البطاطا (PSA) Potato sucrose Agar :-
حضر من مستخلص البطاطا المتكون من 200غم بطاطا بعد غسلها وتقسيرها وتقطيعها وضعت في دورق زجاجي مع 500 مل ماء مقطر وغلقت لمدة 20 دقيقة على نار هادئة ،ثم رشح المزيج باستخدام عدة طبقات من الشاش وأخذ الراشح وأضيف اليه 20 غم آكار مع 10غم سكروز مع التحريك المستمر واكمل الحجم إلى 1 لتر وأضيف المضاد الحيوي الكلورامفينيكول Chloramphenicol 250 ppm ملغم/لتر وعقم بواسطة المؤصدة تحت درجة حرارة 121 م⁰ وضغط 15 باوند/إنج² لمدة 20. واستخدم لتنمية الفطريات .

3-2-2: وسط آكار دكستروز مستخلص البطاطا الجاهز (PDA) Potato dextrose Agar :-

حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة مع إضافة المضاد الحيوي الكلورامفينيكول Chloramphenicol 250 ملغم/لتر وعقم بواسطة المؤصدة تحت درجة حرارة 121 م⁰ وضغط 15 باوند/إنج² لمدة 20. كما في الفقرة 3-2-1.

3-2-3: وسط حبوب الحنطة Wheat grain medium :-

حضر بنفس طريقة محمد ،(2001) بوزن 200غم حنطة بعد تنظيفها وغسلها وتنقيتها من الشوائب في دورق زجاجي سعة لتر و40 مل من الماء المقطر وعقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م⁰ وضغط 15 باوند/إنج² لمدة 20 دقيقة . وأستخدم لغرض إنتاج أكبر عدداً ممكن من الأجسام الحجرية .

3-2-4: الماء المقطر المعقم:

تم تعقيم الماء المقطر بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م⁰ وضغط 15 باوند/إنج² لمدة 20 دقيقة . وأستخدم لغرض إنتاج الاجسام الثمرية من الأجسام الحجرية .

3-3: الصبغات والمحاليل المستعملة:

3-3-1: صبغة اللاكتوفينول أزرق المثيلين Lactophenol cotton blue stain :-
حضرت على وفق Ellis ،(1994) من المواد الآتية:

المثيلين الأزرق 0.05 غم ، بلورات الفينول 20 غم ، كليسيروول 40 مل ، حامض اللاكتيك 20مل و20 مل ماء مقطر، واستخدمت لتصبغ الفطريات وتثبيتها لغرض الفحص المجهرى .

3-3-2: محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH Solution 2 عياري

تم تحضيره من إذابة 8غم من هيدروكسيد الصوديوم في 100 مل ماء مقطر ، وأستخدم لمعايرة الأس الهيدروجيني في الوسط الزراعي.

3-3-3: محلول حامض الهيدروكلوريك HCl 10 عياري:

حضر هذا المحلول حسب التعليمات الخاصة بالشركة المصنعة وأستخدم لغرض تعديل الأس الهيدروجيني للأوساط الزراعية المستخدمة في الدراسة.

3-4: البادئات primers:

إستخدم نوعيين من البادئات وحسب Safaie وآخرون،(2012) الأول الخاص بجين *Sclerotinia* (18 S rRNA gene ITS region) المسؤول عن تشخيص فطر *sclerotiorum* ، والثاني الخاص بتحديد جين *oxaloacetate acetylhydrolase*

المسؤول عن إنتاج حامض Oxalic acid gene ، حيث تم تصميم البادئات في هذه الدراسة عن طريق موقع بنك الجينات Genbank NCBI وباستخدام برنامج Primer3plus لتصميم البادئات والخاصة في فحص ال PCR وتم تجهيز البادئات من قبل شركة Bioneer : الجدول 4: يمثل البادئات التي استخدمت في هذا الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي ونتائج فحص PCR:

Primer	Sequence		Amplicon
18S rRNA gene	F	GTAGGTGAACTGCGGAAGGA	399bp
	R	GCCGCCACTGATTTTAGAGC	
Oxalic acid gene	F	AAACAAGCGTTGTGGCCATC	128bp
	R	CTGTGCGTGCAATCAACACA	

1-*Sclerotinia sclerotiorum* genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: SfGa-107

Gen Bank: AB937099.1

2-*Sclerotinia sclerotiorum* strain Ep-1PNA5 oxaloacetate acetylhydrolase-like protein gene, complete cds

Gen Bank: FJ825294.1

تمت تنمية الفطر على وسط الPDA عن طريق زراعة جسم حجري واحد في مركز الطبق في درجة 20⁰ م ، لمدة إسبوع في الحاضنة لإجراء تفاعل PCR عن طريق أخذ الغزل الفطري من حافة المستعمرة للطبق النامي، تم إجراء فحص PCR وذلك لتشخيص فطر *Sclerotinia sclerotiorum* وكذلك لتحديد جين oxaloacetate acetylhydrolase المسؤول عن إنتاج حامض Oxalic acid gene وحسب طريقة (Munoz - Cadavid وآخرون ، 2010 و Safaie وآخرون ، 2011 و Grabicoski وآخرون ، 2015) .

3-5- العُدَد Kits :

الجدول 5: العُدَد التي استخدمت في الدراسة مع اسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ.

ت	اسم العدة	مكوناته	الشركة وبلد المنشأ
1	عدة استخلاص الحمض النووي الفطري EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Mini-Preps Kit	EZ-10 Column 50	Biobasic Canada
		2.0 ml Collection Tube 50	
		Universal Digestion Buffer 12 ml	
		Universal Buffer PF 6 ml	
		Universal Buffer BD 12 ml	
		Universal PW Solution (concentrate) 18 ml	

	Universal Wash Solution (concentrate) 7.5 ml		
	TE Buffer 10 ml		
	Proteinase K (10mg/ml) 1.2 ml		
Bioneer (Korea)	TopDNA polymerase	عدة فحص	2
	dNTP (dATP, dCTP, dGTP, Dttp)	Accupower® PCR PerMIX	
	Tris-HCl (pH 9.0), KCl, MgCl ₂		
	Stabilizer and tracking dye		

6-3: طرائق العمل Methods:

1-6-3 : جمع العينات Samples collection :

تم جمع سيقان نباتات الباذنجان المصابة من المزارع القريبة من الكلية التقنية المسيب وأخذت منها الأجسام الحجرية واستناداً إلى الأعراض المظهرية والتشخيص الأولي، شخخص الفطر بعد زراعة الأجسام الحجرية على وسط PDA اعتماداً على صفاته المزرعية وتكوينه للأجسام الحجرية والفحص المجهرى للغزل الفطري كما سيذكر لاحقاً. حيث غسلت الأجسام الحجرية بالماء العادي ثم عقت سطحياً بغمرها لمدة ثلاث دقائق بمحلول الكلوراكس التجاري 6%، وغسلت عدة مرات بالماء المقطر المعقم، وجففت على أوراق ترشيح معقمة.

2-6-3: تنمية الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* :

تم زراعة جسم حجري واحد في وسط طبق بتري حاوي على وسط PDA المضاف إليه الكلورامفينيكول 250 ملغم/لتر وبعد خمسة أيام من الحضانة وقبل أن يكون الأجسام الحجرية، تم تقسيم الطبق إلى قطع مكعبة، وذلك لغرض إكثار الفطر على وسط الحنطة كما جاء في محمد، (2011) وكما موضح في الفقرة 3-2-3. لإنتاج أكبر عدد ممكن من الأجسام الحجرية. كما استخدمت نفس الطريقة لغرض تشخيص الفطر.

7-3: تشخيص الفطر:

1-7-3: التشخيص المظهري للفطر *S. sclerotiorum* :

شخص الفطر على وفق Kohn، (1979) و Tariq وآخرون، (1985) و Saharan و Mehta، (2008)، وباستخدام طريقة زراعة جسم حجري واحد في وسط طبق بتري يحوي على وسط PDA المضاف إليه الكلورامفينيكول 250 ملغم/لتر. وبعد الحضانة لمدة خمسة ايام بدرجة حرارة 20 ± 2 م⁰ لوحظ الغزل الفطري الأبيض وبعدها تكونت الأجسام الحجرية. تم تحضير شرائح زجاجية من الغزل الفطري وصبغت بصبغة اللاكتوفينول و تم وضع غطاء الشريحة Coverslips، فحست تحت المجهر لملاحظة الغزول الفطرية العقيمة وتأكد التشخيص.

2-7-3: التشخيص باستخدام فحص PCR :

تم إجراء فحص PCR للتأكد من إن الفطر هو *S. sclerotiorum*، وذلك باستخدام البادئات الخاصة بجين (18S rRNA gene ITS region) الأول المسؤول عن تشخيص الفطر *S. Sclerotiorum*، والثاني الخاص بتحديد جين oxaloacetate acetylhydrolase

المسؤول عن إنتاج حامض الأوكزاليك Oxalic acid gene. وتكون الفحص من عدة خطوات:

3-7-2-1: استخلاص الحامض النووي من الفطر Fungus DNA extraction :
تم إجراء استخلاص الحامض النووي من عينات مستعمرات الفطر، وذلك باستخدام عدة الـ (EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Mini-Preps Kit) وأجري الإستخلاص حسب تعليمات الشركة كآلاتي:

1-نقل 200مليغرام من مزرعة الفطر *S.sclerotiorum* على وسط PDA الى حاوية خزفية معقمة وباستخدام النايتروجين السائل ذو درجة حرارة -169°C تم سحق المستعمرات الفطرية ومن ثم نقلت الى انابيب معقمة سعة 1.5 ml .

2-اضيف 180µl من محلول Universal Digestion Buffer و 20µl من انزيم Proteinase K الى كل عينة، و تم مزجت جيدا بواسطة جهاز المازج، ومن ثم حضنت العينات بدرجة حرارة 56 C° لمدة 30 دقيقة.

3-اضيف 100µl من محلول Universal Buffer PF ومزج بواسطة قلب الانابيب حضنت بدرجة حرارة -20 C° لمدة 30 دقيقة.

4-وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000rpm لمدة 5 دقائق. نقل الطافي الى انبوبة سعة 1.5 ml جديدة.

5-اضيف 100µl محلول Universal Buffer BD ومزجت بواسطة المازج.

6- اضيف الكحول الأثيلي المطلق Absolute ethanol 96% إلى جميع العينات ومزجت بواسطة المازج.

7- نقل المزيج الى انابيب خاصة تحتوي على فلتر لإستخلاص الحامض النووي المجهزة مع العدة EZ-10 column موضوعة داخل انابيب جامعة collection tube سعة 2ml ومن ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقة وتم التخلص من الراسب.

8-اضيف 500 µl من محلول Universal PW Solution بعدها وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقة وتم التخلص من الراسب.

9- اضيف 500 µl من محلول Universal Wash Solution ومن ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقة وتم التخلص من الراسب.

10- وضعت عمود EZ-10 column الحاوية على الحامض النووي في انابيب معقمة سعة 1.5 ml وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقتان لتجفيف غشاء العمود EZ-10 column membrane من الكحول وتم التخلص من الراسب.

11- اخيراً اضيف 50 µl من محلول الـ TE Buffer لإذابة الحامض النووي داخل الـ EZ-10 filter column وحضنت في درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة وبعدها وضعت جميع

الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقة لجمع الحامض النووي وبعدها نقل إلى الحفظ بدرجة حرارة -20 في الثلاجة لحين الاستعمال في فحص الـ PCR.

3-7-2-2 : فحص الحامض النووي المستخلص DNA profile :

تم الكشف عن الحامض النووي DNA المستخلص من الفطر، وذلك عن طريق استخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer الخاص بالكشف وقياس تركيز الاحماض النووي (DNA and RNA) حيث يتم الكشف الحامض النووي عن طريق تحديد تركيز الحامض النووي (DNA ng\µl) وقياس نقاوة الحامض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين (260-280 nm) وتم استخدام الجهاز على النحو الآتي :

1- بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحامض النووي نوع DNA .

- 2- نقوم بتصفير ركيزة المقياس مرتين باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز وذلك بوضع 1 مايكروليتر من (ddH₂O) على سطح ركيزة المقياس وإجراء التصفير وبعدها نقوم بتنظيف الركيزة لقياس العينات.
- 3- نقوم بالضغط على زر التشغيل لبدء عملية قياس تركيز ال DNA ، وذلك باستخدام 1 مايكروليتر من كل عينة من ال DNA المستخلص ومن ثم نقوم بتنظيف ركيزة المقياس الجهاز مرة اخرى لقياس العينة الاخرى.
- 4- تم تحديد نقاوة عينات ال DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية جهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين (260/280) nm حيث إن الحامض النووي DNA المستخلص يعد نقياً عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8).

3-2-7-3: تحضير مكونات تفاعل البوليميز المتسلسل PCR Components
تم تحضير خليط تفاعل PCR حسب تعليمات الشركة Bioneer كما موضح في الجدول 6.

الجدول 6 : يوضح مكونات تفاعل البوليميز المتسلسل PCR Components

PCR Components	Volume
DNA template	5 µL
Forward primer (10 pmol)	1.5µL
Reverse primer (10 pmol)	1.5µL
PCR water	12µL
Total	20µL

ذلك تم وضع
خليط تفاعل
التي ذكرت

بعد
مكونات
PCR

في الجدول أعلاه إلى أنابيب حجم 0.2ml خاصة بعدة فحص ال PCR (PCR Premix Accupower®) والحاوي على بقية مكونات تفاعل ال PCR ومن ثم نقلت جميع الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي المازج (Exispin) vortex centrifuge بسرعة 3000rpm لمدة ثلاث دقائق ومن ثم وضعت في جهاز PCR Thermocycler.

3-2-7-4: ظروف الدورات الحرارية لفحص PCR Thermocycler :
conditions

تم إجراء فحص PCR باستخدام جهاز PCR Thermocycler وحسب كل جين كما في الجدول التالي:

هذا ولم تختلف ظروف الدورة الحرارية المستخدمة لتشخيص الجين عنها في تحديد الجين المسؤول عن إنتاج حامض الأوكزاليك .

الجدول 7: يوضح ظروف الدورات الحرارية لفحص PCR Thermocycler conditions

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95C	5min
Denaturation	30	95C	30sec.
Annealing		58C	30sec.
Extension		72C	30sec.
Final extension	1	72C	5min
Hold	-	4C	Forever

3-7-2-5: تحليل نتائج فحص ال PCR:

تم إجراء الترحيل الكهربائي Agrose gel electrophorsis باستخدام هلام الأكرز بنسبة 1% وذلك لقراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة PCR product analysis وفقا لما أورده (Sambrook وآخرون، 1989 و Al azawy، 2011). كما يأتي:

1- اذيب 1 غم من هلام الأكرز Agarose gel في 100 مل من محلول ال TBE buffer الدائري بتركيز 1X وباستخدام جهاز Microwave لمدة 5 دقيقة.

2- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50م وبعدها اضيف 3 ميكروليتير من صبغة الحامض النووي اللاصقة Ethidium bromide ومزجت مع الهلام.

3- صب هلام الأكرز في قالب الترحيل Tray الحاوي على المشط Comb لتحديد اماكن عينات PCR, وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ومن ثم ازيل المشط من الهلام بعناية.

4- حملت عينات ناتج الفحص PCR product ووضعت في حفر الهلام.

5- استخدم سلم القياس 100 DNA ladder لقياس ناتج PCR product ووضع في الحفرة الأولى.

6- بعد اكتمال عملية التحميل تم غمر هلام الأكرز باستخدام محلول TBE Buffer الدائري بتركيز 1X وغلق غطاء الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل باستخدام تيار 100 فولت و 80 امبير لمدة ساعة واحده.

7- بعد إنتهاء عملية الترحيل فحص الهلام الحاوي على ناتج PCR باستخدام الأشعة فوق البنفسجية U.V light source لتحديد الناتج مع وحدة القياس وتم تصويرها باستخدام كاميرا رقمية.

3-8: تأثير بعض الظروف البيئية في إنتاج الأجسام الثمرية من الجسم الحجري

للفطر *S.sclerotiorum* في الماء المقطر المعقم :

نظرا للحاجة لاعداد كبيرة من الاجسام الحجرية ،نفذت التجارب اللاحقة باستعمال الاجسام الحجرية المنتجة على وسط الحنطة .

3-8-1: تأثير الإضاءة المستمرة في إنتاج الأجسام الثمرية من الجسم الحجري للفطر *S.sclerotiorum*:

نفذت هذه التجربة في ظروف الإضاءة المستمرة داخل المختبر في غرفة النمو Growth Chamber وبدرجات حرارية 10,15,20,25 °م بعد تعقيم الأجسام الحجرية سطحيا بمحلول هايبيوكلورات الصوديوم بتركيز 1% لمدة 2-3 دقائق و غسلت مرتين بالماء المقطر المعقم ، وزعت في أطباق بتري بقطر 9 سم مجهزة بماء مقطر معقم 20 مل /طبق تم تلقيح كل طبق بالأجسام الحجرية بواقع 10 أجسام حجرية لكل طبق بعد تعقيم الماء المقطر بجهاز المؤصدة ، وحضنت بدرجات الحرارة المذكورة أعلاه وفي ظروف إضاءة مستمرة كل معاملة على حدة بواقع 5 مكررات لكل معاملة بعدها تم مراقبة المعاملات وأخذ القراءات التي شملت عدد الأجسام الثمرية ، وقطرها، وطول السويقات، وعددها وأبعاد الجسم الحجري (ملم) لغاية إنتهاء التجربة .

3-8-2: تأثير الظلام المستمر في إنتاج الأجسام الثمرية من الجسم الحجري للفطر *S.sclerotiorum*:

أجريت بنفس طريقة 3-8-1 باستثناء الحضانة في ظروف الظلام المستمر.

3-9-: دراسة بعض معايير النمو للأجسام الثمرية وعلاقتها بالجسم الحجري المتكونة منه:

نفذت هذه التجربة عن طريق زراعة عشرة أجسام حجرية في كل طبق يحتوي على ماء مقطر معقم تحت ظروف المختبر للحصول على الأبواغ الكيسية للفطر، واستمرت هذه التجربة شهرين حضانة في غرفة النمو لحين إنتاج الأجسام الثمرية وتم حساب المعايير الآتية:

أ- معدل عدد السويقات Stips المنتجة من الجسم الحجري تم حسابها بطريقة العد المباشر.

ب- معدل طول السويقات Stips المنتجة من الجسم الحجري تم قياسها مباشرة باستخدام المسطرة المدرجة.

ج- معدل عدد الأقماع Apothecium المنتجة من الجسم الحجري تم عدها مباشرة بالعين المجردة .

د- معدل قطر الأقماع Apothecium المنتجة من الجسم الحجري تم قياسها مباشرة باستخدام المسطرة المدرجة.

وتم حساب معامل الارتباط Correlation coefficient (r) بين كل من الطول ، العرض ، المساحة كمتغير مستقل y وبين كل من عدد السويقات ، طول السويقات ، عدد الأجسام الثمرية وقطر الأجسام الثمرية كمتغيرات معتمدة y .

هـ - معدل ابعاد الاكياس المنتجة Ascus من الجسم الثمري، تم الاستعانة بالمجهر المركب وباستعمال ocular lens حيث أخذ مقطع صغير من الجسم الثمري Apothecium ووضع على شريحة نظيفة تحوي قطرة من صبغة اللاكتوفينول وبعد وضع غطاء الشريحة تم الضغط عليه بلطف من منتصف الغطاء لكي تخرج الأبواغ والأكياس مررت الشريحة بسرعة على لهب بسيط لضمان جفاف الصبغة وفحصت تحت المجهر .

و- معدل عدد الأبواغ المنتجة من الجسم الثمري تم حسابها باستخدام جهاز عد كريات الدم الحمر Haemocytometer، أخذت 5 أقماع من الأجسام الثمرية Apothecium وسحقت بواسطة مشرط حاد ومعقم وأضيفت إلى 5 مل من الماء المقطر المعقم ورجت جيدا لإنتشار أبواغ الفطر بشكل متجانس في الماء ،أخذ 1مل واضيف الى 1 لتر وتم حساب

معدل عدد الأبواغ في مل بالعد بشريحة العد Haemocytometer ومن ثم تم حساب معدل عدد الأبواغ جسم/ لتر بالضرب في معامل التخفيف $60 = 60 \div 1000$ بوغ/مل كالآتي :
 المعدل $\times 25 \times 10^4 =$ معدل عدد الأبواغ /مل
 $10^7 \times 15 = 10^6 \times 150 = 10^4 \times 25 \times 600$
 $10^7 \times 3 = 5 \div 10^7 \times 15$ بوغ/مل .

وهذا يعني أن كل جسم ثمري واحد عند وضعه في 1 مل من الماء المقطر المعقم يتكون عالق يحتوي كل واحد مل منه 60 بوغ ، كما تم حساب معامل الارتباط r) Correlation (coefficient) بين كل من الطول والعرض للجسم الحجري كمتغيرين مستقلين \times وكل من طول، وعرض الاكياس البوغية ascus وعدد الأبواغ، طول و عرض الأبواغ، كمتغيرات معتمدة y .

10-3: دراسة نمط توزيع الأجسام الحجرية Pattern of sclerotia distribution:

1-10-3: طريقة الحصول على أبواغ مفردة single spore method:

أخذ 1 مل من مزيج الأبواغ بنفس طريقة 3-9-9، و، واضيف إلى طبق بتري يحوي على وسط PSA الحاوي على الكلورامفينيكول 250 ملغم/لتر ووزع على الوسط بالتساوي من خلال الحركة الرحوية للطبق، حضنت المزارع بدرجة حرارة 10 ± 2 م⁰، تم مراقبة إنبات الأبواغ خلال 24 ساعة بمساعدة المجهر الضوئي وعند مشاهدة إنبات البوغ، حددت منطقتيه ورفعت مع جزء من الوسط وزرعت في وسط PSA المضاف إليه الكلورامفينيكول 250 ملغم/لتر وكل حسب تجربته.

2-10-3: زراعة الأبواغ المفردة للحصول على نمط توزيع الأجسام الحجرية:

حيث تم زراعة بوغ واحد تم أخذه من 3-10-1 في وسط طبق بتري يحتوي على الوسط PSA ثم زراعة بوغيين بشكل متقابل بعد تنصيف الطبق بخط وهمي، ثم زراعة ثلاثة أبواغ في الطبق بعد تقسيمه على ثلاثة أجزاء بشكل وهمي ثم أربعة وخمسة أبواغ، بعد تقسيم الطبق على أجزاء وهمية أربعة وخمسة على التوالي وبعشرين مكرر لكل معاملة، حضنت بدرجة حرارة 10 ± 2 م⁰. سجلت النتائج بعد عشرة أيام بعد إكمال تكوين الأجسام الحجرية ودراسة نمط توزيعها. صممت التجربة كتجربة بسيطة One-way analysis ضمن التصميم العشوائي الكامل CRD بعامل واحد هو عدد الأبواغ: بوغ واحد، بوغان ،، ثلاثة أبواغ ، وأربعة أبواغ وخمسة أبواغ وبعشرين مكرر أي بما يساوي 100 وحدة تجريبية وقورنت المتوسطات باستعمال أقل فرق معنوي LSD على مستوى احتمال 0.05، (الراوي وخلف الله، 1981).

11-3: دراسة تأثير تراكيز ملحية مختلفة في نمو الفطر وتكوين الأجسام الحجرية :

أستخدمت تراكيز ملحية من NaCl ، لبيان تأثيرها في معدل النمو الخضري وإنتاج الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*، إذ تم زراعة بوغ مفرد للفطر والمأخوذ من الفقرة 1-10-3 في تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم شملت (0.0، 0.145، 0.58، 1.16) غم ، محسوبة بالملي مكافئ / لتر (meq/l) حسب Maas و Hoffman (1977)، ولان 100 ملي مكافئ / لتر هو العتبة لأكثر النباتات من حيث إنبات البذور ونمو

النبات والانتاجية، فاخذ هذا التركيز وضعفه وربعه، فضلا عن معاملة الصفر نوبت التراكيز الملحية في لتر من الماء المقطر وتم اضافته إلى الوسط الغذائي PSA الحاوي على 250 ملغم/لتر من الكلورامفينيكول كل تركيز على حدة، وعقمت الأوساط بجهاز المؤصدة بعدها صبت الأوساط في أطباق بتري وتركت لتبرد ومن ثم لقحت بعالق الأبواغ بواقع 1مل لكل طبق ووزع بالتساوي على سطح الوسط الغذائي PSA لكل المعاملات بواقع عشرين مكرر لكل معاملة. حضنت بدرجة حرارة 10 ± 2 م⁰، أخذت نتائج معدل النمو بعد 3، 6، 12، 48 ساعة ثم حسبت عدد الأجسام الحجرية بعد عشرة أيام من الحضن. صممت التجربة كتجربة عاملية Factorial experiment ضمن التصميم العشوائي الكامل Completely randomized design (CRD) حيث مثل العامل الأول أربعة تراكيز من 0.145، 0.58، 1.16، 0.0 ومثل العامل الثاني مدة الحضن وهي : 3 ، 6 ، 12 ، 48 ساعة اي 16 معاملة وبعشرين مكرر اي بمجموع 320 وحدة تجريبية. وقورنت متوسطات المعاملات باستعمال إختبار أقل فرق معنوي Least Significant Difference (LSD) على مستوى احتمال 0.05 (الراوي وخلف الله، 1980).

وبالنسبة للتركيز وعدد الأجسام الثمرية فأجريت التجربة كتجربة بسيطة One-way analysis ضمن التصميم العشوائي CRD لعامل واحد بأربعة مستويات هي 0.145 ، 0.58 ، 1.16 ، 0.0 وبعشرين مكرر اي بما يساوي 80 وحدة تجريبية وقورنت المتوسطات بين المعاملات باستعمال أقل فرق معنوي LSD مع مستوى 0.05 ، الراوي وخلف الله، (1980).

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

1-4- تشخيص الفطر مظهريا ووراثيا:

شخص الفطر *S. sclerotiorum* اعتمادا على خصائص الجسم الثمري ،اذ بينت الملاحظات العامة للفطر (الشكل 1) ،بدءا من جمع العينات وصولا إلى التشخيص المجهرى وعلى وفق المفاتيح التصنيفية بأن الفطر هو *S. sclerotiorum* .

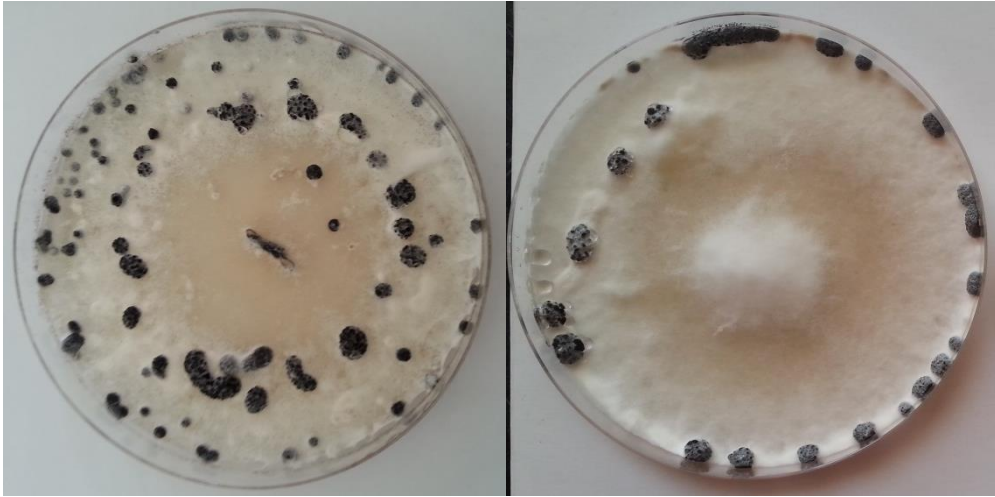


الشكل 1:الأعراض المرضية لمرض العفن الأبيض على الباذنجان الذي يسببه الفطر *S.sclerotiorum* ،ويظهر عليه 1: الغزل الفطري، 2 :الجسم الحجري.

أظهرت النتائج في الشكل 2 ،ان الغزل الفطري غطى الطبق بالكامل بعد خمسة أيام من التلقيح على شكل مايسيليوم أبيض ،وبدأ بإنتاج الاجسام الحجرية Sclerotia على وسط PDA بعد إسبوع من التلقيح واختلفت اعداد واحجام الاجسام الحجرية ونمط توزيعها وهذه النتيجة توافق مع ما توصل اليه محمد ،(2001)، وامتازت الاجسام المنتجة على الوسط PDA بانها ذات أشكال غير منتظمة فبعضها كروي وبعضها متطاوول ومقعرة من السطح الداخلي واحيانا ملتصقة مع بعضها، واختلفت عن الاجسام الحجرية المتكونة على العائل، بكون الاخيرة لا تكون مقعرة، فضلاً عن لونها الأسود و صلابة قشرتها الخارجية، وهذه

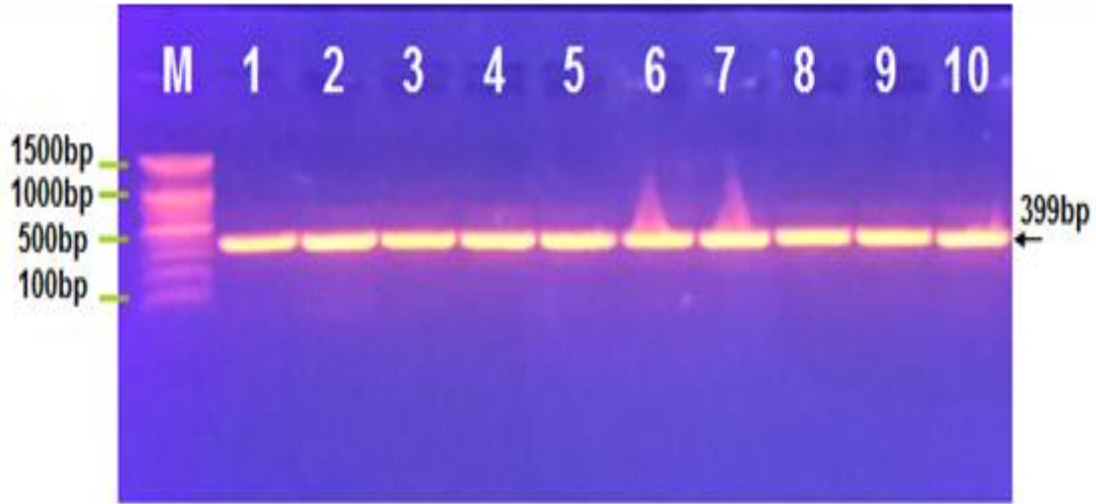
النتائج مشابهة لما توصل إليه Michael وآخرون ، (2009) ، إذ بين إن اللون الأسود الصلب للجسم الحجري هو الطبقة الاولى من الجسم التي تحتوي على خلايا سميكة منتجة لصبغة الميلانين Melanin ، وتلعب دورا في عملية حماية الفطر *S. sclerotiorum* ، أما الطبقات الأخرى فلا تكون صلبة لعدم إحتوائها على الصبغة. اما التذبذب في إنتاج الاجسام الحجرية على الوسط الزراعي PSA على الرغم من كونها محضنة في درجة حرارة تراوحت بين $20 \pm$ 2 ضمن حدود المدى الحراري المناسب الذي ذكره المظفر،(2013) في نتائجه ، وهذا مشابه لما ذكره Coung و Dohroo ، (2006) ، إذ بينا أن نمو الفطر يكون بأعلى معدلاته عن درجة الحرارة $20-25$ م⁰ على وسط الـ PSA ، اما إنتاجه للأجسام الحجرية فيكون في المدى $15-20$ م⁰ وهذا قد يرجع إلى ظروف تجريبية ووراثية ، أن الارتفاع في درجات الحرارة يمكن أن يؤدي إلى تحطيم عدد من الأنزيمات مثل أنزيم pectinase و أنزيم Polygalacturonase (Motallebi وآخرون، 2008 و Rehman، 2009) .

كما تم ملاحظة مراحل تكوين الأجسام الحجرية الثلاثة ، والتي بدأت بتجمع الغزل الفطري على شكل كتل بيض ما تلبث ان تتحول إلى اللون البني ومن ثم إلى اللون الأسود مع خروج افرازات عديمة اللون اختفت عند نضج الاجسام الحجرية، وتتفق هذه النتائج مع سميرونعمه،(2013).



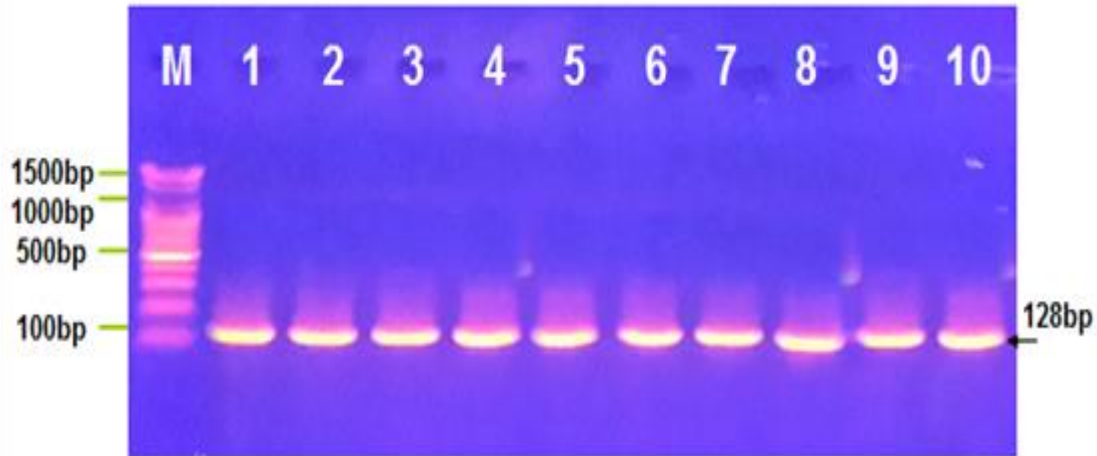
الشكل 2: الغزل الفطري للفطر *S.sclerotiorum* مع مراحل تكون الاجسام الحجرية على وسط الـ PSA بدرجة حرارة 20 ± 2 خلال مدة حضن اسبوعين، تظهر فيه اختلاف عدد الاجسام الحجرية واختلاف اقطارها واختلاف نمط توزيعها.

وبعد التشخيص المظهري للفطر *S. sclerotiorum* تم تأكيد التشخيص باستخدام تقنية الـ PCR إذ تبين إن هذه العزلة مشابهة لخصائص العزلة المشار لها من قبل محمد والمظفر، (2013). ومتوافقة لما ذكره Safaie وآخرون، (2012) على الرغم من استخدام القطعة الجينية المتمثلة 18S r RNA gene (الشكل 3).



الشكل 3: صورة الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الأكرورز ، والذي يظهر نتائج فحص الـ PCR لجين ITS1 region ، 18S rRNA gene والخاص بتشخيص فطر *S. sclerotiorum* حيث يمثل M: Marker (1500-100bp) الحفر من (1-10) عزلات الفطر الموجبة للفحص بناتج 399bp.

بينت نتائج (شكل 4) ، أن الفطر *S. sclerotiorum* له القدرة على إنتاج حامض الأوكزاليك بعد تحديد الجين المسؤول عن إنتاج هذا الحامض والذي يدعى oxaloacetate . acetylhydrolase وهذا يؤكد ما توصل إليه محمد والمظفر ، (2013) وكذلك محمد والجبوري، (2013) ، في إن هذه العزلة قادرة على إنتاج حامض الأوكزاليك من خلال تجارب معايرة الحامض مع برمنغنات البوتاسيوم . إن حامض الأوكزاليك مهم لمعرفة ضراوة الفطر وقابليته على إصابة العائل فكلما كان إنتاجه من الحامض عالياً كلما كانت ضراوته أكبر وهذا يعتمد على العديد من الظروف البيئية (محمد والمظفر ، 2013).



الشكل 4 : صورة الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الأكرول، والذي يظهر نتائج فحص ال PCR لجين oxaloacetate acetylhydrolase والخاص بإنتاج حامض Oxalic acid في عزلة فطر ال *S. sclerotiorum* حيث يمثل M: Marker (1500-100bp) الحفر من (10-1) عزلات الفطر الموجبة للفحص بنتائج 128bp.

2-4 - تأثير بعض الظروف البيئية في إنتاج الأجسام الثمرية من الجسم الحجري للفطر *S. sclerotiorum* في الماء المقطر:

4-2-1- تأثير درجات حرارية مختلفة مع إضاءة مستمرة:

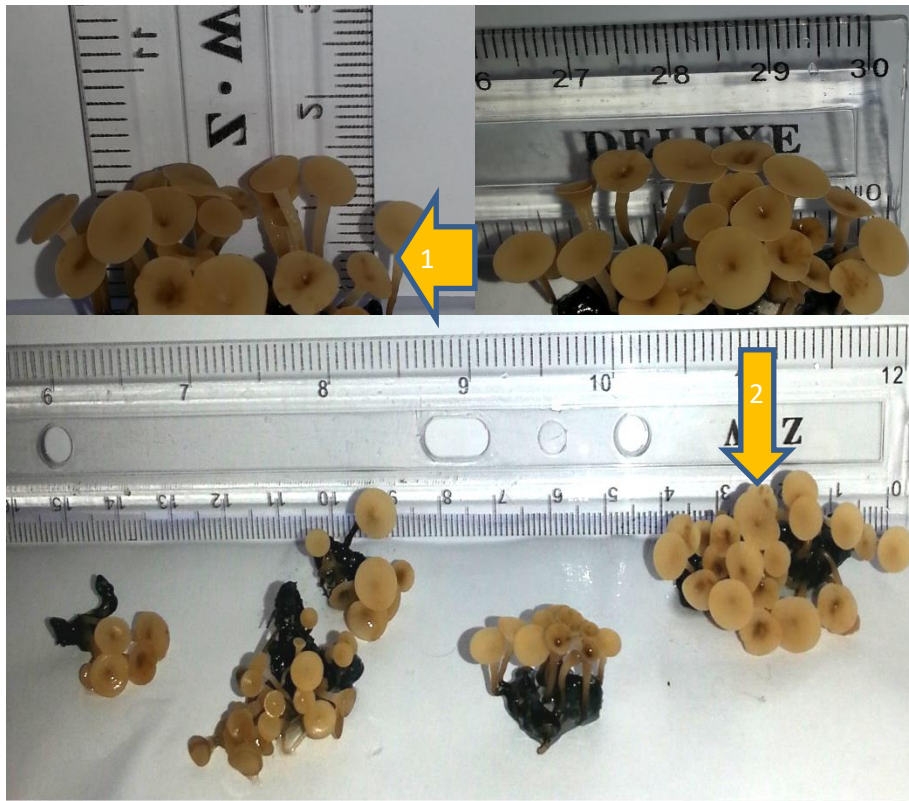
أظهرت النتائج في الجدول 8، إن بداية إنتاج الأجسام الثمرية بدأ في الأسبوع الثالث في كل من الدرجات الحرارية 10، 15، 20⁰ م واستمر تطوير السويقات مع زيادة طول الفترة الزمنية للحضن من الأسبوع السابع حيث ظهرت بداية تكوين الأقماع Apothecium وأكمل نموها في الأسبوع الثامن من الحضن تحت ظروف الإضاءة المستمرة ، بينما لم تسجل درجة حرارة 25⁰ م أي تطور في الجسم الثمري للفطر . مما يدل على إن درجات الحرارة من -20 10⁰ م مناسبة لتطوير الأجسام الثمرية ، وهذه النتيجة متوافقة مع ما توصل إليه محمد (2001) ، في أن درجات الحرارة المنخفضة مناسبة لإنبات الجسم الحجري وتكوين الأجسام الثمرية بشرط توفر الإضاءة . وبين Willetts و Wong (1980) ، أن السويقات تطورت إلى شكل يشبه القمع أو الكوب يدعى apothecium أو الجسم الثمري وكانت الأقماع بنية اللون محمولة على حامل أو سويق stipe بطول 5-21 ملم في، حين سجل قطر أقراسها 2-9 ملم (الشكل 5)

الجدول 8: يوضح تطور وتكوين الجسم الثمري في درجات حرارة مختلفة وتحت ظروف الإضاءة المستمرة بالماء المقطر المعقم.

درجات الحرارة	25	20	15	10	الأسبوع
الأول	0	0	0	0	
الثاني	0	0	0	0	
الثالث	0	ظهور نتوء من سطح الجسم الحجري	ظهور نتوء من سطح الجسم الحجري	ظهور نتوء من سطح الجسم الحجري	

0	بداية تكون السويقات	بداية تكون السويقات	بداية تكون السويقات	الرابع
0	تكون السويقات	تكون السويقات	تكون السويقات	الخامس
0	استطالة السويقات بصورة قصيرة	استطالة السويقات بصورة قصيرة	استطالة السويقات بصورة قصيرة	السادس
0	إستمرار استطالة السويقات وبداية تكوين القمع	إستمرار استطالة السويقات وبداية تكوين القمع	إستمرار استطالة السويقات وبداية تكوين القمع	السابع
0	تكون الجسم الثمري من الجسم الحجري	تكون الجسم الثمري من الجسم الحجري	تكون الجسم الثمري من الجسم الحجري	الثامن

ان الأجسام الحجرية المختلفة في الطول والعرض كونت أجساما ثمرية إختلفت في عددها وكما سيناقتش لاحقا، فكلما كان الجسم الحجري كبيراً كان عدد الأجسام الثمرية المتكونة أكثر؛ وذلك لكثرة المواد الغذائية المخزونة في الجسم الحجري الكبير، وأشار Mila و Yang ، (2008) ، أن درجة الحرارة المناسبة للإنبات الجنسي للفطر *S. sclerotiorum* تكون في الغالب بين 10-20⁰ م، إلا إن درجات الحرارة إختلفت بين الدراسات المختبرية. وواضح Kohn، (1979)، إن إنبات الجسم الثمري عادة ما يتطلب أجسام حجرية تكون رطبة لمدة أسبوع أو أسبوعين قبل الإنبات وتحصل في أعماق التربة تصل إلى 2 سم، ويمكن لجسم ثمري واحد او اكثر أن يمتد من الجسم الحجري للوصول إلى سطح التربة. كما أكد Huang وBardin ، (2001) أن تكوين الجسم الثمري يتطلب الرطوبة للإنبات والعدوى . ان العوامل البيئية المتمثلة بدرجة حرارة التربة، رطوبة التربة والضوء تؤثر على تكوين الجسم الثمري للفطر *S. sclerotiorum* (Huang و Yeung ، 2002)، وبعد الضوء عاملاً بيئياً مهماً له تأثيراً على تطور الجسم الحجري وتكوين السويقات والأجسام الثمرية للفطر *S. sclerotiorum* وبين Letham، (1975)، ان للضوء تأثيراً في الفترة اللازمة لظهور السويقات المتكونة من الجسم الحجري، وانه تظهر بعد 3 أسابيع بوجود الضوء وبعد 10أسابيع بلغ عددها 65.5 سويق لكل 10 أجسام حجرية وكانت Apothecia دائرية و بقطر 9-2 ملم .



الشكل 5: الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* وبأحجامها المختلفة بعد ثمانية اسابيع من الحضانة بالماء المقطر المعقم بدرجة حرارة 10، 15، 20⁰ م واضاءة مستمرة منتجة للأجسام الثمرية المكونة من 1-السويق 2- الجسم الثمري .

4-2-2- تأثير درجات حرارية مختلفة مع ظلام مستمر:

اتضح من الجدول 9، أن ظروف الظلام المستمر في الماء المقطر المعقم كان سببا في ظهور بدايات السويقات من الجسم الحجري عند درجات حرارية 15 و 20⁰ م واستمرت السويقات في الاستطالة، ولم تظهر الأقماع مطلقا حتى الأسبوع الثامن وهو نهاية التجربة كما في الشكل 6، بينما لم تظهر السويقات مطلقا في درجة حرارة 25⁰ م، وهذه النتيجة مشابهة لما توصل إليه محمد، (2003a) ومحمد، (2003b) ومحمد، (2001) في أن السويقات تظهر في الجسم الحجري وتستمر بالإستطاله في ظروف الظلام المستمر، ولم تظهر السويقات في درجات الحرارة 25⁰ م سواء في ظروف الأضاءة المستمرة أو الظلام المستمر. وهذه النتائج تتفق مع Henderson (1962)، إذ بين ان السويقات تستمر بالإستطاله في الظلام وعند تعرض السويقات للضوء تتكون الأجسام الثمرية، بينما ذكر Letham (1975) أنه في ظروف الظلام في درجات حرارة 5-20⁰ م ظهرت السويقات بعد 12 اسبوعيا وكان عددها 107 لكل 10 أجسام حجرية بعد 20 اسبوعيا من الحضانه. ولدرجة الحرارة تأثير على عدد وطول السويقات و إن المدى الحراري الأفضل يقع بين 10-20⁰ م في حين، بين Abawi و Grogan (1975) إن هذا المدى الحراري يقع بين 10-25⁰ م ؛ وقد يعود هذا الاختلاف إلى نوع السلالة المستخدمة في الدراسة. وكذلك مشابهة لما ورد في سمير ونعمه، (2013). ومن حيث تأثير الضوء فقد بين Honda و Yonoki (1977) ، أن السويقات الناتجة من الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* لا تتطور إلى أجسام ثمرية إلا بوجود الضوء . هذه النتائج تتفق مع محمد، (2001) حيث أوضحت إن للضوء تأثيرا كبيرا في إنبات الأجسام الحجرية وتكوين الأجسام الثمرية فلم يظهر أي إنبات جنسي في ظروف الظلام في أي من درجات الحرارة التي تتراوح بين 5-50⁰ م لكن ظهر إنبات جنسي بين درجات الحرارة من 5-20⁰ م في ظروف الإضاءة المستمرة فقط بشده 650 لوكس. كما ذكر Kosasih و Willetts (1975) ، إنهما لم يتمكنوا من الحصول على أي جسم ثمري عند اختبار 200 عزله من الفطر *S. sclerotiorum* في الظلام الكامل. ويتأثر إنتاج الجسم الثمري بعدد من العوامل البيئية و الحيوية مثل الجهد المائي في التربة و درجات الحرارة و الاضاءة و وجود العوامل الكيميائية وعمق الجسم الحجري في التربة، فضلاً عن عوامل وراثية و وظيفية و التي تلعب دورا هاماً في إنتاج ونمو الجسم الثمري Clarkson وآخرون، (2003).

الجدول 9 : تطور سويقات الجسم الثمري للفطر *S. sclerotiorum* عند درجات حرارة (10، 15، 20، 25) وتحت ظروف الظلام المستمر بالماء المقطر المعقم وخلال مدة حضانة 8 أسابيع.

25	20	15	10	درجات الحرارة °م مدة الحضن(اسبوع)
0	0	0	0	الأول
0	بداية ظهور نتوء من الجسم سطح الحجري	بداية ظهور نتوء من الجسم سطح الحجري	0	الثاني
0	ظهور السويقات من الجسم الحجري	ظهور السويقات من الجسم الحجري	بداية ظهور نتوء من الجسم سطح الحجري	الثالث
0	استطالة السويقات	استطالة السويقات	ظهور السويقات من الجسم الحجري	الرابع
0	استطالة السويقات	استطالة السويقات	استطالة السويقات	الخامس
0	استطالة السويقات	استطالة السويقات	استطالة السويقات	السادس
0	استطالة السويقات وبداية ظهور سويقات جديدة صغيرة	استطالة السويقات وظهور سويقات جديدة صغيرة	استطالة السويقات وظهور سويقات جديدة صغيرة	السابع
0	الاستمرار بالإستطاله وظهور سويقات صغيرة جديدة	الاستمرار بالإستطاله	استطالة السويقات وظهور سويقات جديدة	الثامن



نكل 6:
لاجسام
حجرية
للفطر

S.sclerotiorum



وبأحجامها المختلفة بعد 8 اسابيع من الحضان بالماء المقطر المعقم بدرجة حرارة 10، 15، 20⁰ م وظلام مستمر منتجة للسويقات Stipes فقط.
3-4 :دراسة بعض معايير النمو للأجسام الثمرية وعلاقتها بالجسم الحجري المتكونة منه :

لقد تم حساب معامل الارتباط Correlation Coefficient (r) بين كل من طول وعرض الجسم الحجري (المساحة) كمتغير مستقل وبين كل من عدد السويقات وطول السويقات وعدد الأجسام الثمرية وقطر الأجسام الثمرية كمتغيرات معتمدة Y . وتم الحصول على المعنوية في الحالات التالية :

$$0.390 = r \text{ عرض الجسم الحجري} \times \text{عدد السويقات}$$

$$0.540 = r \text{ مساحة الجسم الحجري} \times \text{عدد السويقات}$$

$$0.940 = r \text{ مساحة الجسم الحجري} \times \text{قطر الأجسام الثمرية}$$

هنالك فروقات معنوية أو علاقة ارتباط بين كل من طول وعرض الجسم الحجري كمتغير مستقل وبين كل من عدد السويقات وطول السويقات وقطر الأجسام الثمرية كمتغيرات معتمده y كما موضح في الجدول 10 ، وملحق 1.

الجدول 10: معامل الارتباط بين طول وعرض الجسم الحجري(ملم) وكل من عدد السويقات(ملم) وطول السويقات(ملم) وعدد الأجسام الثمرية وقطر الأجسام الثمرية(ملم) .

الصفات	قيمة معامل الارتباط
طول الجسم الحجري × عدد السويقات	-0.046
طول الجسم الحجري × طول السويقات	0.262
طول الجسم الحجري × عدد الأجسام الثمرية	- 0.042
طول الجسم الحجري × قطر الأجسام الثمرية	0.209
عرض الجسم الحجري × عدد السويقات	0.390*
عرض الجسم الحجري × طول السويقات	0.113
عرض الجسم الحجري × عدد الأجسام الثمرية	0.306
عرض الجسم الحجري × قطر الأجسام الثمرية	- 0.149
مساحة الجسم الحجري × عدد السويقات	0.540*
مساحة الجسم الحجري × طول السويقات	0.261
مساحة الجسم الحجري × عدد الأجسام الثمرية	0.019
مساحة الجسم الحجري × قطر الأجسام الثمرية	0.940***

أظهرت هذه النتائج العلاقة بين مساحة الجسم الحجري أو العرض، وهو شكل من أشكال المساحة السطحية وما ينتجه الجسم الحجري من سويقات، فضلا عن توفر خزين جيد من المواد الغذائية الذي يدعم تكوين الأجسام الثمرية. أما بقية النتائج التي لم ترتبط بمعنوية بحسب معامل الارتباط فقد يصعب تفسيرها، نظرا لكثرة التداخلات، وبالتالي يمكن استخلاص حقيقة أنه كلما زادت مساحة الجسم الحجري المعرضة للظروف الملانمة، كلما زادت من فرص إنتاج السويقات، والتي مستقبلا ستتطور وتحمل الأجسام الثمرية التي تكون سببا في نشر الأبواغ الجنسية بعد إكمال نضج تلك الأبواغ .

اما تأثير أبعاد الاجسام الحجرية في أبعاد الأكياس البوغية وعددها وطول وعرض الابواغ الكيسية:

عن طريق تحضير شريحة من جزء صغير من الجسم الثمري وتصيغه بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء وفحصه تحت المجهر، وجد انه يتكون من الأكياس البوغية التي تكون شفافة وأسطوانية الشكل والأبواغ الكيسية ضمن الطبقة الخصيبية مع خيوط عقيمة بين الكياس، وتحتوي الأكياس البوغية على ثمانية أبواغ كيسية بيضوية الشكل مرتبة بشكل اهليلجي (الشكل 7). وهي بذلك بنفس الوصف الذي وصفه كلا من Webster و Weber ، (2007) بأن الطور الجنسي للفطر يتكون من الأبواغ الكيسية التي توجد داخل أكياس وتتأثر هذه الأكياس في أجسام ثمرية كأسية الشكل محمولة على سويق ينشأ من نسيج حشوي فطري Stromata . ويتضح من الجدول 11 ، ملحق 2 ، وجود اختلافات في طول الكيس وعرضه، وعدد الأبواغ لكل كيس ويرجع هذا الاختلاف إلى عدم نضوج الأكياس في وقت واحد، كما و قد يعود اختلاف عدد الأبواغ إلى كون الأكياس قد اطلقت بعض أبواغها إذ لا يتجاوز عدد الأبواغ عن ثمانية أبواغ كيسية في الكيس الواحد، وهذه النتائج تتفق مع Le tuorneau ، (1979) إذ بين إن النسيج الفطري يستمر بالنمو ليكون هايفات متشابكة تحتوي المناطق الفعالة منها على سايتوبلازم كثيف مكونة ما يعرف بالسويق، والذي يحمل في نهايته تركيب قمعي الشكل ذو طبقة داخلية خصبة تسمى Hymenium Layer و تحتوي الأكياس البوغية ويضم كلا منها ثمانية ابواغ كيسية، كما تم مشاهدة انطلاق الأبواغ الكيسية من الجسم الثمري بعد فتح غطاء الطبقة على شكل يشبه الدخان المتصاعد او السحابة او ما تسمى بظاهرة النفخ Buffing، وقد توافقت هذه النتائج مع Raynal (1990) إذ لاحظ انطلاق الابواغ الكيسية في الهواء المشبع وأن هنالك إطلاق منتظم مستمر للـ ascospores في النوع *S. trifoliorum* في الهواء المشبع، إن إطلاق البوغ من قبل الجسم الثمري من *S. sclerotiorum* بسهولة عن طريق إزالة الغطاء من الطبقة المغلق الذي يحتوي على apothecia في بيئة مشبعة ويرجع هذا الإطلاق إلى الانخفاض المفاجئ في نسبة الرطوبة و الضغط المتولد نتيجة انخفاض الرطوبة. كما بينت النتائج في نفس الجدول ان ابعاد الكيس البوغي تتراوح بين 15-31 طولا و2-13 مايكرومتر عرضا، اما ابعاد الابواغ تتراوح بين 7-3 طولا و 2-5 مايكرومتر عرضا وتتفق هذه النتائج من عدد من الباحثين (Cuong و Dohroo، 2006 و Barari وآخرون، 2010). إذ أوضحوا إن الأكياس عديمة اللون اسطوانية الشكل ذات ابعاد تتراوح بين 4.9-8.5 X 1-9.5-16.5 مايكرومتر، إذ ان كل كيس يحتوي على 8 أبواغ كيسية Ascospores مرتبة بشكل إهليلجي و تتراوح ابعادها بين X 5.6-13 4.2-6.6 مايكرومتر. ومن هذه التجربة نستنتج ان الكياس البوغية والابواغ الكيسية هي من الصفات الرئيسية في تصنيف الفطر، والتي لا تتأثر بكون الاجسام الحجرية المنتجة لها كبيرة او صغيرة من خلال طول وعرض الجسم الحجري، وبهذا فعند حساب معامل الارتباط بين كل من طول وعرض الجسم الحجري كمتغيرين مستقلين X في كل من عدد الابواغ وطول الابواغ وعرض الابواغ كمتغيرات معتمدة y فلم تكن علاقة الارتباط علاقة معنوية بين هذه المتغيرات .

الجدول 11: يوضح معامل الارتباط بين طول و عرض الجسم الحجري (ملم) وكل من طول و عرض البوغ (مايكروميتر) وعدد الابواغ.

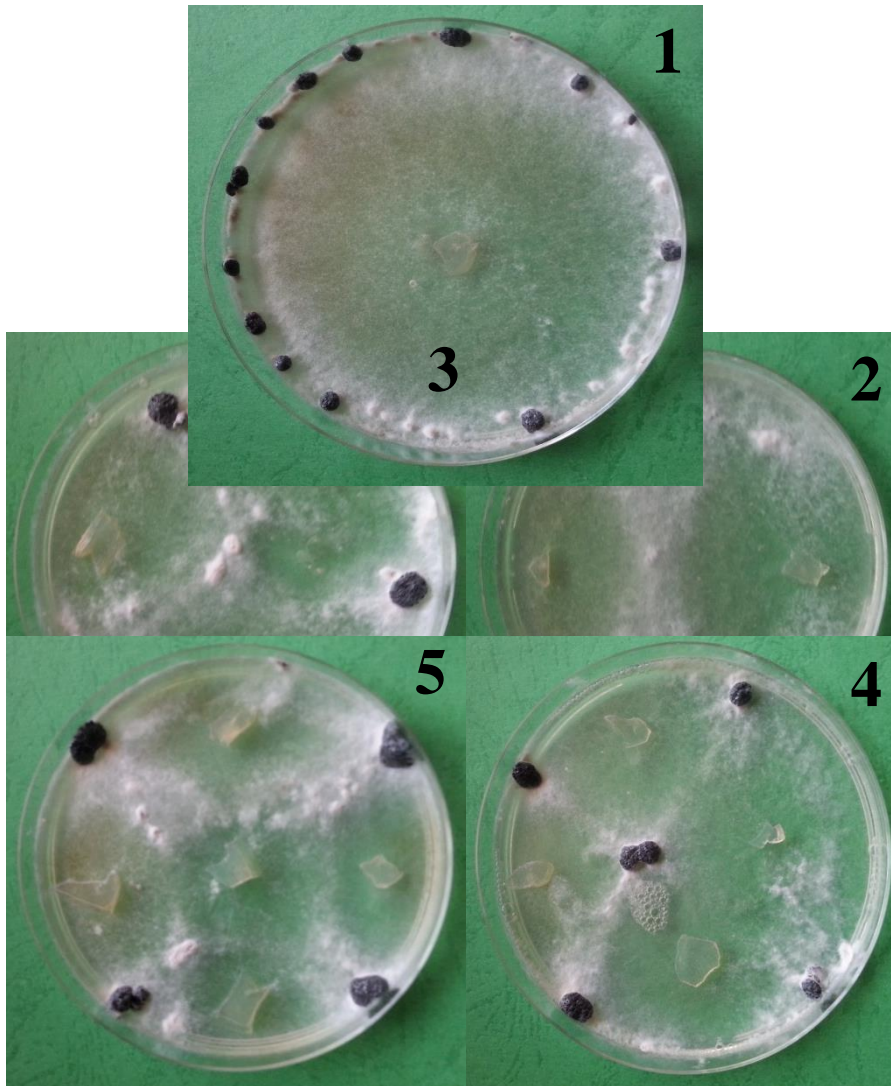
الصفات	قيمة معامل الارتباط
طول الجسم الحجري × عدد الأبواغ	0.306
طول الجسم الحجري × طول البوغ	0.283
طول الجسم الحجري × عرض البوغ	0.129
عرض الجسم الحجري × عدد الأبواغ	0.097
عرض الجسم الحجري × طول البوغ	0.159
عرض الجسم الحجري × عرض البوغ	-0.089

الشكل 7: مقطع عرضي في الجسم الثمري للفطر *S. sclerotiorum* يبين 1- الأكياس البوغية 2- الأبواغ الكيسية 3- الشعيرات العقيمة في الماء المقطر المعقم بدرجة حرارة 10، 15، 20 ° م وإضاءة مستمرة بقوة تكبير 40× بعد مدة حضانة 8 أسابيع.

4-4- : زراعة الأبواغ المفردة وعلاقتها بعدد ونمط توزيع الأجسام الحجرية: يتضح من الجدول 12، أن هنالك فروقات معنوية بين عدد الأبواغ المزروعة وبين تكون الأجسام الحجرية. وظهرت النتائج ان زراعة بوغ مفرد ادى الى انتاج اكبر عدداً من الاجسام الحجرية واختلفت معنويًا عن الزراعة المزدوجة، او الثلاثية، او الرباعية، او الخماسية . بينما شكلت الزراعة الرباعية انتاج اجسام حجرية اختلفت معنويًا عن كل من الزراعة الثنائية والثلاثية، عندما يوجد بوغ واحد فالمزرعة لا توجد فيها منافسة وتستمر حتى الأطراف عندما يقل الغذاء تتكون الابواغ ،بينما ثلاث تكون الأبواغ عند خطوط التقاء المزارع الناتجة من أبواغ مختلفة كما موضح في الشكل 8 وقد يعزى ذلك وجود ظاهرة الانعزال الوراثي في حالة وجود عزلات غير متوافقة، وهذا ما حصل مع المعاملات التي احتوت على أكثر من بوغ، فظهرت نموات بيضاء محددة ، وهذا مشابه لما تطرق اليه Karimi وآخرون،(2012).

وبين الشكل 8 ، ان زراعة بوغ مفرد ادى الى حصول نمو متجانس، كما ان نمط توزيع الاجسام الحجرية كان طرفيا ولا وجود للنمط المنتشر او الوسطي، بينما اتخذت المعاملات الاخرى انماط توزيع مختلفة، فضلا عن ظهور حالة الانعزال وكما اوردها Karimi وآخرون، (2012) ، واختلف نمط تكوين الأجسام الحجرية في الطبقات بعضها تركز في الوسط بشكل غير منتظم وبعضها على حافات الطبقات بشكل منتظم وهذه النتائج تتفق مع باحثين آخرين (Dohroo و Cuong ، 2006 و Ojaghian ، 2009 و Meng وآخرون ، 2011) ، وبين Wong و Willetts (1980) إلى أن توزيع الاجسام الحجرية كان بنمط منتظم او غير منتظم ؛ والذي ربما يعود الى الظروف الغذائية او نوع العزلة . لقد أكد الجبوري،(2013) إنه قد حصل على نمط توزيع للأجسام الحجرية بشكل منتظم وغير منتظم . وأشار Bae و Knudsen (2007) أن نمط توزيع الأجسام الحجرية يعد من العوامل المؤثرة في المكافحة الأحيائية لعزلة الفطر *S. sclerotiorum*.
الجدول 12 : العلاقة بين عدد الأبواغ المزروعة على وسط PSA بدرجة حرارة 20 ° م وعدد الاجسام الحجرية المنتجة بعد عشرة ايام من الزراعة.

عدد الأبواغ	عدد الاجسام الحجرية
1	7.1
2	4.4
3	3.9
4	5.7
5	5.4
LSD _(0.05)	1.137



:8

الشكل

العلاقة بين عدد الأبواغ المزروعة على وسط PSA بدرجة حرارة 20⁰ م وعدد ونمط توزيع الاجسام الحجرية المنتجة بعد عشرة ايام من الزراعة :
 1- زراعة بوغ واحد 2- زراعة بوغين 3- زراعة ثلاثة ابواغ 4- زراعة اربعة ابواغ 5- زراعة خمسة ابواغ .

4-5: دراسة تأثير تراكيز ملحية مختلفة من NaCl في نمو الفطر خلال 48 ساعة وتكوين الأجسام الحجرية بعد عشرة ايام من الحضانة بدرجة حرارة 20±2⁰ م:
 يتضح من الجدول 13، أنه توجد فروقات معنوية بين مدة الحضانة وتبين ان الحضانة 12 ساعة لم يختلف معنويًا عن 48 ساعة، وهذا يدل على إنه بوجود تراكيز ملحية سيؤدي إلى بطئ في النمو الخضري للفطر، والتي اختلفت معنويًا عن مدة الحضانة 3 و 6، اما بالنسبة الى تأثير التركيز فإن زيادة تركيز الأملاح يؤدي إلى قلة في النمو عند 0.58 و 0.145 وهناك فروقات معنوية ايضا في بقية التراكيز إما نتيجة التداخل فإن أعلى قيمة للنمو حصلت في الماء المقطر المعقم (عينة المقارنة) وعند 48 ساعة واختلفت معنويًا عن بقية المعاملات للفطر *S.sclerotiorum* خلال 48 ساعة وهذا يتفق مع ما ورد في محمد (2001).

الجدول 13: تأثير التراكيز الملحية من NaCl ومدة الحضانة في النمو الخضري للأبواغ المفردة للفطر *S.sclerotiorum* .

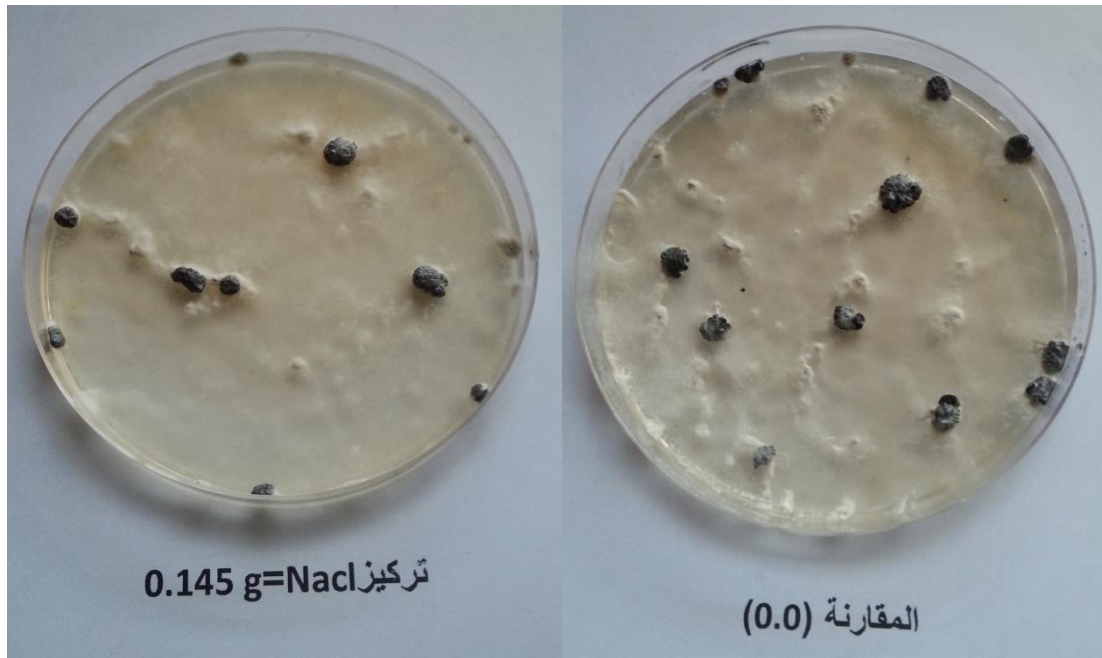
معدل تأثير التركيز	مدة الحضانة / ساعة				معدل النمو (ملم) / غم/ لتر
	48	12	6	3	
35.2	46.5	46.5	28.3	19.3	0.000
22.4	32.6	32.6	16.2	8.0	0.145
20.3	25.8	25.8	12.7	16.8	0.580
31.1	43.3	43.3	25.0	12.6	1.160
	37.1	37.1	20.6	14.2	معدل تأثير مدة الحضانة
	التركيز=1.343 مدة الحضانة=1.343 التداخل=2.687				L.S.D _{0.05}

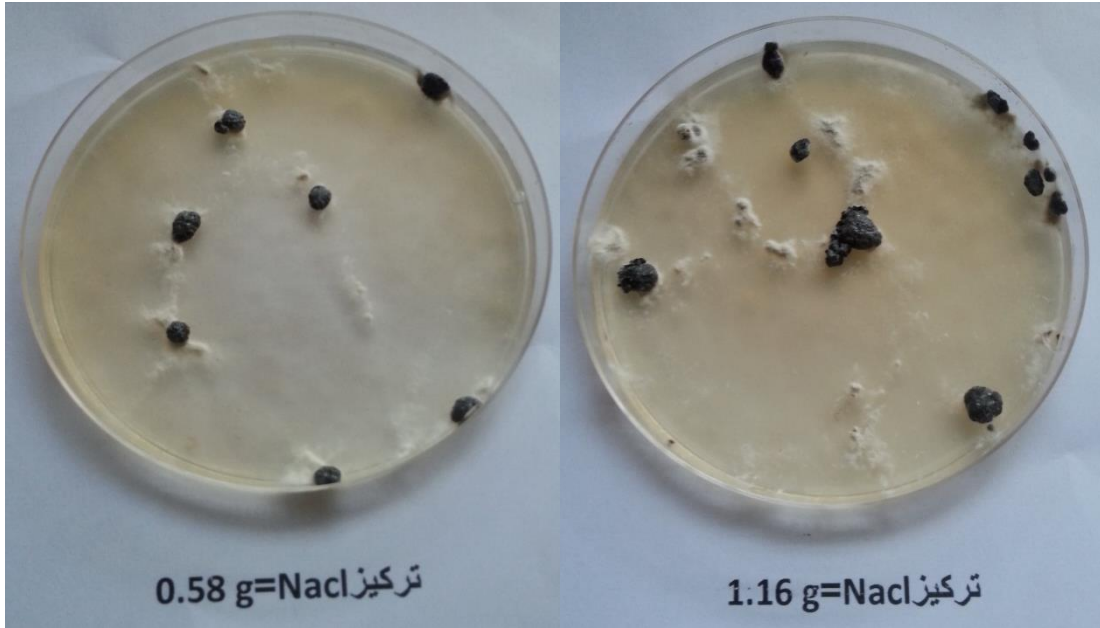
يتضح من الجدول 14 ، عدد الأجسام الحجرية المنتجة من زراعة بوغ مفرد في تراكيز مختلفة من ملح NaCl، إنه عند زيادة تركيز الأملاح أدى إلى قلة في عدد الأجسام الحجرية مقارنة بعينة المقارنة المتمثلة بالماء المقطر المعقم إذ بلغ معدل عدد الأجسام الحجرية 9.35 وهو الحد الأعلى من الأجسام الحجرية مقارنة ببقية المعاملات الأخرى ، وهذا قد يعود إلى جاهزية المواد الغذائية وقدرة الفطر على استخدام الغذاء الموجود لصالح نموه الخضري ومن ثم تكوين الاجسام الحجرية. فعند التركيز 0.145 الذي يمثل ربع من قيمة حد العتبة فكان معدل عدد الاجسام الحجرية 3.45 ، و0.58 الذي يمثل النصف كان معدل عدد الاجسام الحجرية 3.80 وبلغ التركيز 1.16 أقل عدداً من الأجسام الحجرية فبلغت 2.50 ، كما موضح في الشكل 9 ، وهذه النتائج كانت مشابهة لما ذكره Hassan و Shahzad (2004) ، في أن للتراكيز الملحية تأثيراً في نمو الفطر *S. Sclerotiorum* وتكوين الأجسام الحجرية مثل ملح كلوريد

الصوديوم NaCl ، ان التراكيز العالية من الملح (105ملغم/لتر) أدت إلى تثبيط تكوين الأجسام الحجرية للفطر، فيما لا يوجد تأثيرا كبيرا أو مباشرا في نمو الغزل الفطري للفطر *S. Sclerotiorum*، كلما زاد تركيز الأملاح المضافة إلى الوسط حتى يصل إلى أقل معدل نمو عند التراكيز العالية 75 و 100 مليمايرون بعد فترة حضانة تصل إلى 72 ساعة ، وكذلك يمكن أن تؤثر على الفطر من خلال فعاليتها المضادة لبناء الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* ، والذي كان لها دور كبير في تثبيط إنتاج الأجسام الحجرية و إختزال عددها حتى عند التراكيز الأقل (Erper وآخرون، 2011).

الجدول 14 : تأثير تراكيز ملحية مختلفة في معدل عدد الأجسام الحجرية في طبق قطر 9 سم على وسط PSA.

معدل عدد الاجسام الحجرية	التركيز(غم)
3.45	0.145
3.80	0.580
2.50	1.160
9.35	المقارنة 0.0
1.28	LSD(0.5)





الشكل 9 : تأثير تراكيز ملح كلوريد الصوديوم NaCl في انتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* بعد عشرة ايام من الحضانة بدرجة حرارة 20⁰م.

الاستنتاجات و التوصيات:

الاستنتاجات:

- 1-شخص الفطر *S.sclerotiorum* اعتماداً على التراكيب التكاثرية وتم تأكيد التشخيص من خلال نجاح البادئ 18Sr RNA gen.
- 2- نجاح البادئ Oxalic acid gene في تحديد الجين المسؤول عن إنتاج حامض الأوكزاليك للفطر *S.sclerotiorum*.
- 3- أثرت العوامل البيئية من درجات الحرارة والإضاءة أو الظلام في إنتاج السويقات Stipes والأجسام الثمرية Apothecium من الجسم الحجري .
- 4- يوجد ارتباط عالي بين عرض الجسم الحجري وعدد السويقات وبين مساحة الجسم الحجري و عدد السويقات وكذلك بين مساحة الجسم الحجري و قطر الأجسام الثمرية .
- 5- لم يكن هنالك ارتباط بين طول او عرض الجسم الحجري وطول وعرض الاكياس او طول وعرض الابواغ الكيسية، مما يؤكد عدم اعتمادها في التصنيف المظهري والمجهري للفطر .
- 6- اختلف عدد الاجسام الحجرية المنتجة من بوغ مفرد وتفوقت في عددها عن حالة وجود اكثر من بوغ في الطبق ، كذلك ارتبطت مع نمط توزيع تلك الاجسام في الطبق.
- 7- هنالك تذبذب في النمو الخضري للفطر بوجود تراكيز ملحية من ملح NaCl وخاصة في الساعات الاولى من الحضن ، وتبين الانخفاض في معدل النمو في التركيز الذي يمثل 100 ملي مكافئ /لتر وهو تركيز العتبة ، في حين اعطى تركيز الربع وتركيز الضعف معدل نمو اعلى ، وعد هذا هو نوع من المقاومة .

التوصيات

- 1- اجراء دراسات واسعة للبحث عن سلالات جديدة من الفطر *S.sclerotiorum* في العراق.
- 2- استخدام تقنيات جزيئية متطورة مثلا DNA sequencing في تشخيص الفطر وتسجيله في البنك الجيني العالمي.
- 3- التحري عن بعض عوامل الضراوة الاخرى في الفطر ،فضلا عن حامض الأوكزاليك وتشخيص الجين المسؤول عنها جزيئيا.
- 4- اجراء دراسات موسعة حول العوامل المؤثرة في انتاج الاجسام الثمرية الحجرية ونمط توزيعها وتأثير العوامل البيئية الاخرى وتأثيرها على انتاج الاجسام الثمرية والابواغ الكيسية.

الراوي ،خاشع محمود وخلف الله ،عبد العزيز محمد (1980).تصميم وتحليل التجارب الزراعية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي -جامعة الموصل .

حناوي ،محمد جبير(1986).دراسة ومقاومة حياتية للفطر *Sclerotinia sclerotiorum*
(Lib.) deBary على محصول الباذنجان في البيوت البلاستيكية .رسالة ماجستير .جامعة
بغداد،62 صفحة .

الجبوري ،ميثم ناصر نعمه،(2013). تأثير بعض الفطريات على الصفات الفسلجية و الجزيئية
للأجسام الحجرية المنتجة بالمختبر للفطر *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de
Bary و علاقتها بحيويته . رسالة ماجستير. جامعة كربلاء، 85 صفحة .

سمير، صالح حسن ونعمه، رباب علي(2013).بعض الصفات المظهرية للفطر *Sclerotinia*
Sclerotiorum (Lib.) De Bary. مجلة العلوم الزراعية العراقية - 44(5): 629-
635.

شريف، فياض محمد.(2012).فسلجة الفطريات . الذاكرة للنشر والتوزيع ،الطبعة
الاولى،398صفحة.

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 (2012).تأثير فترة الخزن في حيوية الأجسام الحجرية المنتجة من
الفطر *Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) De Bary والفطريات المرافقة. مجلة
الفرات للعلوم الزراعية- 4(2):189-180.

محمد ،بان طه والجبوري، ميثم ناصر نعمه (2013). تأثير بعض الاوساط الزرعية والرقم
الهيدروجيني في نمو الفطر *Sclerotinia sclerotiorum* وانتاج حامض الأوكزاليك
مجلة جامعة كربلاء العلمية ،المجلد 11،العدد 4.

محمد، بان طه والمظفر، حيدر عبدالمنعم (2013) . تشخيص سلالة الفطر *Sclerotinia*
sclerotiorum باستخدام الـ PCR وتقدير حامض الأوكزاليك المنتج تحت ظروف بيئية
وكيميائية مختلفة، مقبول للنشر في مجلة الفرات للعلوم الزراعية، المجلد5،العدد3 .

محمد، بان طه والوندأوي احسان شفيق ديمرداغ، (2004). الاستخدام الامثل للبسترة الشمسية في السيطرة على الفطر *Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) De Bary. مجلة جامعة كربلاء - المجلد 2، العدد 7: 36 - 46.

محمد، بان طه (2003a). تأثير الفترة الزمنية للحضن في استمرارية انتاج الاجسام الثمرية للفطر *Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) De Bary. مجلة علوم المستنصرية - 14 (1) 45-48.

محمد، بان طه (2003b). تأثير نوعيات مختلفة من المياه في بعض صفات النمو للأجسام الحجرية للفطر *Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) De Bary المجلد 1، العدد 4: 137-142.

المظفر، حيدر عبد المنعم محمد، (2013). دراسة بعض المؤثرات البيئية والكيميائية في نمو وانتاج الاجسام الحجرية للفطر *Sclerotinia sclerotiorum* رسالة ماجستير . جامعة كربلاء، 75 صفحة.

Reference:

المصادر الاجنبية:

- Abawi, G. S. and Grogan, R. G. (1975) . Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 65 : 300-309. .
- 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.
- Adams, P. B. and Ayers, W. A. (1979). Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*. 69:896-899.
- Agrios, G. N. (1997). *Plant pathology* 4th ed. Academic press, San Diego, CA. p : 358.
- Al-azawy, A. F. N. (2011). A rapid, non enzymatic method for genomic DNA extraction from whole blood and mammalian tissues, *roavs*, 1(5): 279-283.
- Amselem, J. ; Cuomo, C. A. , Van Kan, J. A. L. , Viaud, M. , Benito, E. P. , Couloux, A. , Coutinho, P. M., De Vries, R. P. and Dyer, P. S. (2011). Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*, *PLoS Genetics*, 7(8): 1-27.
- Aurelija, L. ; Zilvinas, L. and 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.
- Barari, H. ; Alavi, V. and 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.

- Bardin, S. D. and H. C. Huang. (2001). Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. *Can J. Plant Pathol.* 23(1):88–98.
- 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 .
- Borriss, H. (2009). Lettuce profile. Agricultural marketing resource center, University of California.
- Bolton, M. D. ;Thomma, B. P. H. J. and Nelson, B. D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen, molecular.
- Bueno EA, Oliveira MB, Andrade RV, Lobo M Jr., (2012). Effect of different carbon sources on proteases secreted by the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* during *Phaseolus vulgaris* infection. *Genet. Mol. Res.* 11: 2171-2181.
- Butler, M. J. ; Gardiner, R. B. and Day, A. W. (2009). Melanin synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycologia*, 101 : 296 – 304.
- Caesar , A. J. and R. C. Pearson , (1983) . Environmental factors affecting survival of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* . *Phytopathology* 73: 1024-1030 .
- Calişkan, M. (2000). The metabolism of oxalic acid, *Turk J. Zool*, 24 :103- 106.
- Carbone, I, Anderson, JB, Kohn, LM. (1999). Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. *Evolution* 53: 11–21.

- Cessna S.G., Sears V.E., Dickman M.B. and Low P.S. (2000). Oxa pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum* suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell* 12: 2191-2200.
- Chitrampalam, P., Wu, B. M., Koike, S. T., and Subbarao, K. V. (2010). Interactions between *Coniothyrium minitans* and *Sclerotinia minor* affect biocontrol efficacy of *C. minitans* *Phytopathology* 100:000-000.
- Clarkson, J. P.; J. Staveley ; K. Phelps ;C.S. Young and J. M. Whipps. (2003). Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycology Res.* 107: 213–222.
- Coley-Smith.J.R.(1960).Studies of the biology *Sclerotium cepivorum* Berk.I.V.Germination of sclerotia.*Ann.Appl .Biol.*48:8-18.cf.
- Cuong, D. C. and Dohroo, N. P. (2006). Morphological, cultural and Physiological studies on *Sclerotinia sclerotiorum* causing stalk Rot of Cauliflower. *Omonrice.* 14: 71 – 77.
- Danielson, G. A., Nelson, B. D. and Helms T. C.(2004). Effect of- *Sclerotinia* Stem Rot on Yield of Soybean Inoculated at Different Growth Stages. *Plant Disease*, 88: 297–300.
- De Bary,A.(1884).Vergl .Morph. Biol.derpilze .Mycet .Bact.216.cited from Purdy,L.H.(1955).Abroader concept of the species *Sclerotinia sclerotiorum* based on Variability .*Phytopathology* 45:421-427.
- Dillard, H. R, Ludwing, G. W. and Hunter, J. E. (1995). Conditioning- sclerotria of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. *Plant Disease* 79:411-415.
- Ellis, D. H. (1994). *Clinical mycology : the human opportunistic mycosis.*, Gillingham printers pty. Ltd. Australia: 166 pp.

- Elsahookie, M. M. and K. M.Wuhaib.(1990). Applications in the Design and Analysis of Experiments. Iraq.Dar Al-Hikma. Baghdad University.Iraq.pp.488 .
- Erper , I. ; Turkkan , M . , Karaca , H .G . andKilic , G. (2011) . Evaluation of in vitro antifungal activity of potassium bicarbonate on *Rhizoctonia solani* AG 4 HG-I, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Trichoderma* sp. AfricanJournal of Biotechnology, 10: 8605–8612 .
- Frate, C. A. and Long, R. F. (2005). *Sclerotinia* in alfalfa: biology and Control in the central valley, University of California.
- Fuckel,L.(1870).Symbolae mycologiae .Naturk 23/24:330-311.cited from Dennis,R.W.G.(1973).Whetzelinia Korf and Dumont asuper fluous name.KewBulletin 29:89-91.
- Garg, H. ; Li H., ; Sivasithamparam, K. ; Kuo, J.and. Barbetti, M. J.,(2010) The infection processes of *Sclerotinia sclerotiorum* in cotyledon tissue of aresistant and a susceptible genotype of Brassica napus,Annals of Botany(106): 897–908.
- Georgiou, C. D. ;Zervoudakis, G. and Petropoulou, K. P. (2003).Ascorbic acid might play a role in the sclerotial differentiation of *Sclerotium rolfsii*, Mycologia, 95(2): 308 – 31.
- Godoy G, Steadman J.R., Dickman M.B. and Dam, R. (1990). Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*.Physiol. Mol. Plant Pathology 37: 179-191.
- Grabicoski,EdilaineMauriciaGelinski, David de Souza JaccoudFilho,Marcos Pileggi, LucianeHenneberg, Marcelo LuizCunha Pierre, Cláudio Mauricio Vrisman,AudreiNisioGebielucaDabul,(2015). Rapid PCR-based

- assay for *Sclerotinia sclerotiorum* detection on soybean seeds. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* 72(1):Piracicaba Jan./Feb.
- Gulya, T. M., Rashid, K. Y. and Masirevic, S. M., 1997. Sunflower Diseases. In: "Sunflower Technology and Production", (Ed.): Schneiter, A. A. Agronomy, Madison, WI, PP.263–379.
- Hassan , S. A. and Shahzad , S. (2004) . Effect of sea salt on in vitro growth of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pak. J. Bot*, 36: 677-682.
- Harel, A., Bercovich, S. and O. Yarden .(2006). Calcineurin is required for sclerotial development and pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* in an oxalic acid independent manner. *Mol. PlantMicrobe Interact* . 19: 682-693.
- Henderson,R.M.(1962).An inhibitory growth correlation in the apothecial stipe of *Sclerotinia sclerotiorum* .*Nature* 195:826.
- Honda, Y. and Yonoki, T. (1977).Control of *Sclerotina* disease of greenhouse eggplant and cucumber by inhibition of development of apothecia .*Plant Disease.Rept.*61:1036-1040.
- Hoyte, S. M.(2012). Epidemiology and management of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in kiwifruit (*Actinidiadeliciosa*(A. Chev.)). Ph. D. thesis.Massey.pp. 227.
- Huang , H. C. and Yeung, J. M. (2002). Biochemical pathway for the formation abnormal sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* ,*Plant Pathology Bulletin* , 11(1): 1-6.
- Ingold, C. T. (1971) *Fungal Spores: their liberation and dispersal* Oxford University Press, London,302P.
- Karimi,E. N. Safaie, and M. Shams-Bakhsh,(2012).Mycelial Compatibility Groupings and Pathogenic Diversity of *Sclerotinia*

- sclerotiorum* (Lib.) de Bary Populations on Canola in Golestan Province of Iran . J. Agr. Sci. Tech. (14): 421-434.
- Karlovsky, p., (1999). Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. Natural toxins .7: 1-23.
- Kirk P. M.; P. F. Cannon, J. C. David (2001). Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 9th edn., Wallingford: CABI Publishing; . pp.655.
- 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.
- Koch S, Dunker S, Kleinhenz B, Röhrig M, Friesland H, von Tiedemann A, (2006). Development of a new disease and yield loss related forecasting model for sclerotinia stem rot in winter oilseed rape in Germany. IOBC WPRS Bulletin Integrated control in oilseed crops 29 (7), 335-341. .
- Kohli, Y, Brunner, LJ, Yoell, H, Milgroom, MG, Anderson, JB, Morrall, RAA, Kohn, LM (1995). Clonal dispersal and spatial mixing in fungus populations of the plant pathogenic , *Sclerotinia sclerotiorum*. Molecular Ecology, 4: 69–77. Kohn, L. M. (1979). A monographic revision of genus *Sclerotinia*, Mycotaxon, 9: 365-444.
- Kohn, L.M. (1979). Delimitation of the economically important pathogenic *Sclerotinia* species. Phytopathology 69:881-886.
- Kora, C. ; McDonald, M. R. & Boland, G. J. (2003). *Sclerotinia* rot of carrot an example of phenological adaptation and bicyclic development by *Sclerotinia sclerotiorum*, Plant Disease, 87(5): 456 – 470.

- Korf, R.P. and Dumont, K.P.(1972).Whetzelinia, a new generic name for *Sclerotinia sclerotiorum* and *S.tuberosa*. *Mycologia*64 :248-251.
- Kosasih ,D. and Willetts, H.J. (1975).Types of abnormal apothecia produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia* 67:89-97.
- Lanoiselet, T. L. H. ; Lanoiselet, V. M. , Lewington, F. K. , Ash, G. J. and Murray, G. M. (2005). Survival of *Sclerotinia sclerotia* under fire , *Australasian Plant Pathology*, 34: 311–317.
- Letham,D.B.,(1975).Stimulation by light of apothecial initials development of *Sclerotinia sclerotiorum*.*Trans. Br.Mycol.Soc.*65:333-335.
- Letham, D.B. and Huett, D. O. and Trimboli, D.S. (1976).Biology and control of *Sclerotinia sclerotiorum* in cauliflower and tomato crops in coastal New South Wales.*plant Disease.Rept.*60:286-289.
- Le tourneau D. (1979). Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture, *Phytopathology*, 69(8): 887 – 890.
- Lu, C. and Mei, X. (2003). Improvement of phenyl ethanoid glycosides production by fungal elicitor in cell suspension culture of *Cistanchedeserticola*, *Biotechnology Letters*, 25: 1437 – 1439.
- Maas,E.V.and Hoffman,M.(1977). Crop Salt Tolerance – Current Assessment.*Journal of the Irrigation and Drainage Division* . pp 115-134.
- Maheshwari,R.,G.Bharadwas and M.K.Bhat.(2000).Thermophilic fungi :their physiology and enzymes microbiology and *Molecular Biology Reviews*, 64(3):461-488.

- Malvarez, G. , Carbone, I. , Grünwald, N. J. , Krishnamurthy, V. S. , Schafer, M. and Kohn, L. M. (2007). New populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from lettuce in california and peas and lentils in washington, The American Phytopathological Society 97:470-483.
- Marciano, P ; Di Lenna, P and Magro, P. (1983). Oxalic acid, cell wall degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiol. Plant Pathol.* 22: 339-345.
- Matheron, M. E. and Porchas, M. (2005) . Influence of soil temperature and moisture on eruptive germination and viability of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. *Plant Disease* , 89:50-54.
- 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, B.M. ; Ludy, R. L. ; Fraley, C. L. and Osterbauer, N. K. (2011).Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on whitloofchicory (*Cichoriumintybus* L.) in Oregon.The3rd NPDN National Meeting Berkeley, California.
- Micales, A. J. (1995). In vitro oxalic acid production by thebrown-rot fungus *Postia placenta* ,*SonderdruckAus: MaterialundOrganismen* 29: 159 -176.
- Michael, J. B. ; Gardiner,R. B. and Day, A. W.(2009). Melanin Synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum* ,*Mycologia*, 101(3): 296– 304.

- Mila, A. L. and Yang, X.B.(2008). Effects of fluctuating soil temperature and water potential on sclerotia germination and apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*. 92:78-82.
- Motallebi, M. ; Zamani, M.R. and Azad, H. A. (2008). Polygalacturonase production by *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of canola stem rot: parameter optimization using taguchi approach , *World Applied Sciences Journal*, 3 (1): 96-101.
- Mueller, D. S. and Harman, G. L. and Pedersen, W. L.(2002). Effect of crop rotation and tillage system on *Sclerotinia* stem rot on soybean. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24: 450–456.
- Munoz-Cadavid, C. ; Rudd ; S. , Zaki, S.R. ; Patel, M.; Moser, S.A. ; Brandt, M. E. and Gomez, B. L. (2010). Improvement molculate detection of fungal DNA in formalin-fixed paraffin- embedded tissues: compararison of five tissues DNA extraction methods using panfungal PCR. *Journal Of Clinical Microbiology*, 48: 2147-2153.
- Noonan, M. P. ; Glare, T. R. , Harvey, I.C. and Sands, D. C. (1996). Genetic comparison of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from new zealand and USA, *Environmental Weeds and Pests*, 49: 126-131.
- 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. and Miller, T. (2003). White mold and potatoes.University of Idaho.
- Patterson, C.L.,and Grogan, R.G. (1985).Differences in Epidemionology and Control of Lettuce Drop caused by *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 69: 766–770.

- Peltier, A. J. ; Bradley, C. A. ,Chilvers, M. I. , Malvick, D. K. ,Daren,S. M. , Wise, K. A. and 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. and Nasser, L. C. B. (2012). Case study : *Sclerotinia sclerotiorum* : genetic diversity and disease control, *The Molecular Basis of Genetic Diversity*. pp. 374.
- Purdy LH (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact .*Phytopathology* 69: 875-880.
- Qin, L., Y. Fua, J. Xiea, J. Chenga, D. Jiangab, G. Liab and J. Huangaa,(2011).A nested-PCR method for rapid detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on petals of oilseed rape (*Brassica napus*).*Plant Pathology* (60): 271–277.
- Quentin, U. (2004). *Sclerotinia sclerotiorum*, occurrence and control.*Kartoffelbau* 8: 318–319.
- Raynal, G. (1990). Kinetics of the ascospore production of *Sclerotinia-trifoliorum* (Eriks) in growth chamber and under natural climatic conditions practical and epidemiologic incidence. *Agronomie* 10:561–572. [In French.]
- Rehman, F. U. ; Aslam, M., Tariq, M. I. , Shaheen, A. , Sami, A. J., Naveed, N. H. and Batool, A. I. (2009). isolation of cellulolytic activities from *Tribolium castaneum* (red flour beetle), *African Journal of Biotechnology*, 8 (23): 6710-6715.
- Riou, C, Freyssinet, G, Fèvre, M. (1991). Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1478–1484.

- Rollins, J.A. and Dickman, M.B. (2001). pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum* : identification of a pacC/RIM1 homolog Appl. Environ. Microbiol. 67: 75-81.
- Roseann, H. L., L. M. Winton. (2006). Differential production of sclerotia by isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* from Alaska Vol.28.
- Saharan, G. S. and Mehta, N. (2008). Sclerotinia diseases of crop plants: biology, ecology and disease management, Department of Scientific and Industrial Research, New Zealand, :531 pp
- Safaie, N. ; Karimi, E. and 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.
- Safaie, N.; Karimi, E. and Bakhsh, M. S. (2012). Mycelial compatibility groupings and pathogenic diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary populations on canola in golestan province of Iran, J. Agr. Sci. Tech. ,14 : 421 -434.
- Sambrook, J. Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schafer, M.R and Kohn, L.M. (2006). An optimized method for mycelial compatibility testing in *Sclerotinia sclerotiorum* Mycologia., 98: 593–597.
- Shew,H.D.and Lucas,G.B.editors.(1991).compendium of Tobacco Diseases.APS press.st.paul,MN.p.28-29.

- Shresti, R. A. Y. (2005). Studies on collar rot complex of *coleusforskohlii* (wild.) Briq. M. Sc. Thesis. University of Agricultural Sciences .Collage of Agriculture, Dharwad,pp.100.
- Smith, D. L. (2004). Biology and epidemiology of *Sclerotinia minor* on Peanut (*Arac hishypogaea* L.) M. Sc. Thesis . North Carolina state university . 105.
- Steadman, J.R. (1983). White mold – a serious yield-limiting disease of bean. *Plant Disease*,67: 346–350.
- Steadman, J. R. ; Schwartz, H. F. and Harveson, R. M. (2011). White mold of dry beans.Colorado State University.pp. 3.
- Stotz, H. U. and Guimaraes, R. L. (2004). Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection, *Plant Physiology*, 136: 3703 – 3711.
- Sun, P., and Yang, X. B.. (2000). Light, temperature, and moisture effectson apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*.*Plant Disease*. 84:1287-1293.
- Suzui,T.and Kobayashi,T.(1972).Disspersal of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib)de Bary on Kidney bean .cited from ,Schwartz, H.F. and J.R. Steadman.(1978).Factors affecting Sclerotium populations of, and apothecium production by, *Sclerotinia sclerotiorum* .*Phytopathology* 68:383-388.Hokaido page 61-68.
- Tariq, V.N.; Gutteridge , C.S. and Jeffries , P. (1985) . Comparative studies of cultural and biochemical characteristics used for distinguishing species within *Sclerotinia*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84(3): 381-397.
- Venette,J.(1998).*Sclerotinia* spore formation ,transport and infection.pp.4-7.In:Proceedings of the *Sclerotinia* Workshop, Fargo, North Dakota ,January 21.

-
- Webster, J. and Weber, R. (2007). Introduction to fungi, Cambridge University Press , UK , 3th Edition, :875 PP.
- Willetts, H. J. and 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.
- Xin Li, H.; Melouk , A. ;Damicone ,J.P. and Jackson, K.E.(1993).Inhibition of *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia rolfsii* by microorganisms in soil amended with Rape seed meal.Phytopathological (Abstr.):83:1365.

**Ministry of Higher Education & Scientific Research
University of Kerbala / College of Education
for Pure Science- Department of Biology**



Morphological and Molecular Study of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary in Babylon Governorate and conditions of its Apothecium Production

**A thesis
Submitted to the Council of the College of Education for Pure
Science , University of Kerbala in partial fulfillment of
requirements for the degree of Master of Science**

In

Biology – (Botany)

by

**Nadia Naif Hussein Mohammed ALmasody
(B. Sc. Kerbala University / 2011)**

**Supervised By
Prof. Dr. B. T. Mohammed**

2015

1437