وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء
كلية التربية للعلوم الصرفة ـ قسم علوم الحياة

دراسة بعض المؤثرات البيئية و الكيميائية في نمو وانتاج الاجسام الحجرية للفطر *Sclerotiniasclerotiorum*

رسالة مقدمةإلىمجلس كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة كربلاء
وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علومفي

علوم الحياة/ علم نبات ـ الفطريات

من قبل

حيدر عبد المنعم محمد

(بكالوريوس / علوم حياة 2009)

بإشراف

أ. م. د. بان طه محمد

1434 هـ

2013 م

بِسْمِ اللهِ الرَّحْمنِ الرَّحِيم

يا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا إِذَا قِيلَ لَكُمْ تَفَسَّحُوا فِي الْمَجَالِسِ فَافْسَحُوا يَفْسَحِ اللَّهُ لَكُمْ وَإِذَا قِيلَ انشُزُوا فَانشُزُوا يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ

سورة المجادلة الاية (11)

الاهداء

الى

جناحين خفقا دفئاً وغمراني حباً
ألهماني قوةً وعلماني صبراً
أبي و أمي

الى كل عين رأت
والى كل اذن سمعت
والى كل ذات ابصرت
بفضل تلك النعمة الربانية .....نعمة العقل

اهدي هذا الجهد المتواضع

حيدر....

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين و الصلاة و السلام على اشرف الخلق و المرسلين ابي القاسم محمد (ص) و على أل بيته الطيبين الطاهرين...

أتوجه بشكري الجزيل لأستاذتي الفاضلة الدكتورة بان طٰه محمد التي تفضلت بالإشراف على إعداد هذه الرسالة ولما قدمته من أراء سديدة ، كان له اثر كبير في إخراج الرسالة بهذا الشكل .

كما أتوجه بالشكر إلى كل من في عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة القسم علوم الحياة ادارة واساتذة لما قدموه من تسهيلات لطلبة الدراسات العليا.

وكذلك أتوجه بالشكر والامتنان إلى الأستاذ الدكتور عبد عون الغانمي لمساعدتي في الحصول على المستلزمات الضرورية لاتمام البحث، وكذلك مساعدته لي في التحليل الإحصائي ، ومن جميل العرفان أن أقدم جزيل الشكر إلى أصحاب القلوب الطيبة والضمائر الحية: الست لقاء حسون، و الست بان موسى، و الاستاذ الدكتور سامي عبد الرضا، و الدكتور حسن ابو المعالي، و الاخ الصديق الاستاذ عقيل عبد نعمة،و د. ياسمين لما قدموه من مساعده علمية ، ولا يسعني إلا إن اشكر اخوتي و زملائي في الدراسات العليا ميثم ناصر، وسناء خادم، و زينة ثامر، وشهله محمد فتحي، وبسمة عزيز، واشكر الاخ الزميل الاستاذ قيصر عبد السجاد و السيد محمد سيد وسام المحنا لما قدموه من دعم معنوي متمنيا لهم المزيد من النجاح و التقدم ،كما اتقدم باشكر الجزيل الى الاستاذ نصير مرزة حمزة لجهده المتواصل في انجاح العمل داخل المختبر وأخيرا أتقدم بعظيم الشكر والامتنان إلى كل من قدم لي يد العون والمساعدة لإتمام هذه الدراسة والله الموفق وهو الهادي إلى سواء السبيل .

حيدر عبد المنعم محمد

إقرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة ادناه نشهد بإطلاعنا على الرسالة الموسومة " **دراسة بعض المؤثرات البيئية و الكيميائية في نمو وانتاج الاجسام الحجرية للفطر *Sclerotinia sclerotiorum*** " وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وكل مايتعلق بها ووجدنا انها جديرة بالقبول بتقدير (امتياز) لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / نبات (الفطريات) .

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. صباح لطيف علوان

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : جامعة الكوفة / كلية الزراعة

التاريخ : / /2013

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. ابراهيم خليل حسون

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : الكلية التقنية / المسيب

التاريخ : / /2013

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. رجاء غازي عبد المحسن

المرتبة العلمية : مدرس

العنوان : كلية الزراعة / جامعة كربلاء

التاريخ : 2013/07/

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :

الاسم :د. بان طه محمد

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء/ كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : 2013/07/

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

أُصادق على ما جاء في قرار اللجنة اعلاه

التوقيع :

الاسم : د.نجم عبد الحسين نجم

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان :عميد كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء

التاريخ : 2013/07/

توصية المشرف

اشهد بان إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة جامعة كربلاء وهي جزءٌ من متطلبات درجة ماجستير في علوم الحياة / النبات .

التوقيع:

الاسم: أ.م.د. بان طه محمد

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة -جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2013

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية أعلاه من قبل الأستاذ المشرف, أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لمناقشتها وبيان الرأي فيها .

التوقيع:

الاسم: د. ستار جاسم حتروش

المرتبة العلمية: استاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة– جامعة كربلاء

التاريخ: / / 2013

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (دراسة بعض المؤثرات البيئية و الكيميائية في نمو وانتاج الاجسام الحجرية للفطر *Sclerotiniasclerotiorum*) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع:

الاسم :

المرتبة العلمية:

الكلية والجامعة:

التأريخ: / /2013

الخلاصة

أُجريت سلسلة من التجارب المختبرية في مختبر قسم علوم الحياة للدراسات العليا / كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء ، و للفترة من كانون الاول 2011 الى تشرين الاول 2012 . وتم تشخيص سلالة الفطر *Sclerotiniasclerotiorum* لاول مرة في العراق اعتماداً على تقانة تفاعل سلسلة البلمرة PolymeraseChein Reaction(PCR) ووجد انه مطابق للسلالة (MCG) وعند التتابعbp 475 و للمنطقة المعروفة باسم Entrobacterial Repetitive Intergenic (ERIC).

درس تأثير عدد من العوامل البيئية كدرجة الحرارة، الرقم الهيدروجيني ونوع الوسط الغذائي، ومن خلال التجارب تبين أنّ درجات الحرارة 10-20°م، ورقم الهيدروجيني الحامضي 3.5 - 6.5 هي الافضل لنمو الفطر و انتاج الاجسام الحجرية، فيما كان الوسط بطاطا دكستروز اكار(PDA) هو الافضل لنمو الفطر وانتاجه للاجسام الحجرية مقارنة بالاوساط الاخرى المستخدمة في الدراسة (وسط المانيتول اكار MA ، وسط الزابك دوكس اكار CDA ووسط الاكار المغذي NA).

كما واختبرت قدرة عدد من المركبات الكيميائية في مقاومة الفطر *S.sclerotiorum*، كمنظمات النموالنباتية كحامضي الجبريليك و الساليسليك، و عدد من الاملاح المغذية ككبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ ، و كاربونات الكالسيوم $CaCO_3$ و كبريتات البوتاسيوم K_2SO_4، إذ اظهرت النتائجأنّ معدل نمو الفطر و انتاجه للاجسام الحجرية إنخفض تحت تأثير التراكيز العالية لكل من كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ و كبريتات البوتاسيوم K_2SO_4 إذ وصل النمو الى اقل معدلاته عند التركيز 10^5ملغم /لتروبواقع 5.75 و 1.8 سم على التوالي فيما لم يتمكن الفطر من انتاج الاجسام الحجرية عند التركيز نفسه. اما كاربونات الكالسيوم$CaCO_3$ لم تظهر تأثيراً في معدل نمو الغزل الفطر ولكن لوحظ حدوث تشوهات و اختلافات مظهرية في الغزل الفطري عند التركيزين 10^4 و10^5ملغم /لترمع ملاحظة انعدام تخليق الاجسام الحجرية عند التراكيز نفسها.

و أظهرت النتائج قدرة حامض الجبرليك على التأثير في نمو الفطر و انتاجه للاجسام الحجرية إذ انخفض معدل نمو الفطر عند التركيزين 200 ،250ملغم /لتر الى 5.25 و 3.87 سم على التوالي مع حدوث تباطؤ في انتاج الاجسام الحجرية ، اما حامض الساليسليك بلغ الفطر اقل معدلات النمو عند التراكيز (100 ، 150 ، 200، 250 ملغم / لتر) وبواقع 0.12 ، 0، 0.25، 0 سم على التوالي . اما الاجسام الحجرية فقد كان نضجها متأخرا عند التركيز100ملغم / لتر وتوقف عن انتاجها عند بقية التراكيز .

ودرست قدرة الفطر على انتاج حامض الاوكزاليك على الوسط السائل تحت تأثير العوامل في اعلاه، اذ سجلت كمية الحامض المنتج عند درجة حرارة 25ºم ، اعلى انتاج بمعدل 7.46 ملغم .فيما سجل انخفاضاً معنويا عند زيادة درجات الحرارة ليصل اقل معدل له عند درجتي حرارة 30 و 35°م بواقع 0.00 ملغم ، اما مستوى الـpH فقد سجل اعلى انتاج 5.5 pH .في حين لم يكن الاختلاف معنوياً عند كل من 7.5pH و 9.5 .واظهرت النتائج وجود فرق معنوي في كمية الحامض المنتج من قبل الفطر تحت تأثير التراكيز العالية للعوامل الملحية التي درست ($(NH_4)_2SO_4$, K_2SO_4و$CaCO_3$) ، إذ لوحظ انخفاضا في قيمة حامض الاوكزليك تحت تأثير $(NH_4)_2SO_4$ إذ بلغت اقل قيمة له 2.95 ملغم عند التركيز 10^4ملغم/ لتر، وتلاه في التأثير المركب K_2SO_4 و بواقع 4.55 ملغم عند التركيز نفسه، في حين عجز الفطر عن انتاج الحامض تحت تأثير $CaCO_3$ عند التراكيز كلها المستخدمة في التجربة. اما منظمات النمو النباتية (GA_3 , SA) فقد اوضحت النتائج ان اقل قيمة للحامض المنتج قد بلغت 1.13 ملغم عند التركيز 150ملغم / لترمن حامض الجبرليك . اما حامض السلساليك فقد سجل اقل قيمة له عند التركيز 200ملغم / لتر وبواقع 2.3 ملغم .

قائمـــــــــــــة المحتويـــــــــات

ت	الموضوع	ص
1	الفصل الأول : المقدمة	1
2	الفصل الثاني : أستعراض المراجع	5
1-2	الفطر *Sclerotinia*spp و حياتيته	5
2-2	العوامل البيئية والكيميائية المؤثرة في نمو الفطروانتاجه للاجسام الحجرية:	10
1-2-2	درجة الحرارة Temperature	10
2-2-2	الأس الهيدروجيني pH	10
3-2-2	شدة الاضاءة (طول فترة الضوء) Lighting	11
4-2-2	نوع الوسط الغذائي	11
5-2-2	تأثير مستويات الملوحة في التربة	12
6-2-2	تأثير منظمات النمو النباتية(PGRs)	13
2-3	حامض الاوكزاليك كعامل ضراوة للفطر oxalic acid	14
3	الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل	18
1-3	الأجهزة والمواد و المحاليل المستخدمة	18
2-3	الأوساط الزرعية المستخدمة	20
1-2-3	وسط أكاردكستروز البطاطا Potato Dextrose Agar (PDA)	20
2-2-3	وسط حبوب القمح	20
3-2-3	وسط سكروز البطاطا السائل : Potato Sucrose Broth	20
4-2-3	وسط المانيتول اكار : Agar mannitol	20
5-2-3	وسط الاكار المغذي Nutrient agar (NA)	21
6- 2-3	وسط الزابك اكارCzapeksDox Agar	21
7-2-3	الصبغات والمحاليل المستخدمة	21
3-3	المواد و المحليل المستخدمة في تقنية PCR	22

4-3	المواد المستخدمة في الترحيل الكهربائي Electrophoresis	23
5-3	البادئ الخاص الذي استخدم في عملية التضخيم للكشف عن نوع السلالة للفطر *S.sclerotiorum*	23
6-3	عزل الفطر وتنقيته	23
7-3	تشخيص سلالة الفطر جزيئيا باستعمال تقانةPCR	24
8-3	تأثير بعض العوامل البيئية والكيميائية في نمو الفطر و تكوين الاجسام الحجرية	27
1-8-3	درجة الحرارة	27
2-8-3	الـpH	27
3-8-3	نوع الوسط الغذائي	28
4-8-3	نوع وتركيز العناصر المغذية	28
5-8-3	نوع وتركيز منظمات النمو النباتية	29
9-3	تقدير كمية حامض الاوكزاليك المنتج من قبل الفطر	30
10-3	التحليل الاحصائي	31
4	الفصل الرابع : النتائج	32
1-4	التشخيص باستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي PCR	32
2-4	دراسة تأثير بعض العوامل البيئية في معدل النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum* و انتاج الاجسام الحجرية	32
1-2-4	درجات الحرارة	32
2-2-4	الرقم الهيدروجيني pH	34
3-2-4	نوع الوسط الغذائي	35
4-2-4	$(NH_4)_2SO_4$	36
5-2-4	$CaCO_3$	38
6-2-4	K_2SO_4	40
3-4	تأثير نوع وتركيز منظمات النمو النباتية في نمو الفطر *S.sclerotiorum* وانتاجه للاجسام الحجرية	42

	1- حامض الجبرليك GA_3	42
	2 - حامض السلساليك SA	44
4-4	تقدير كمية حامض الاوكزاليك Oxalic Acid المنتج من قبل الفطر	47
1-4-4	بتأثير العوامل البيئية	47
2-4-4	بتأثير العوامل الكيميائية	48
3-4-4	تأثير منظمات النمو النباتية	48
5	الفصل الخامس : لمناقشة	50
1-5	التشخيص باستخدام تقنية PCR	50
2-5	تأثير العوامل البيئية و الكيميائية في معدل نمو الفطر *S. sclerotiorum*	50
1-2-5	درجة الحرارة	50
2-2-5	الرقم الهيدروجيني الـpH	51
3-2-5	نوع الوسط الغذائي	52
4-2-5	$(NH_4)_2SO_4$	52
5-2-5	$CaCO_3$	53
6-2-5	K_2SO_4	54
3-5	دراسة تأثير منظمات النمو النباتية في معدل النمو القطري للفطر *S. sclerotiorum* و انتاجه للاجسام الحجرية	55
	1- حامض الجبرليك GA_3	55
	2- حامض السلساليك	56
4-5	تقدير كمية حامض الاوكزاليك Oxalic Acid المنتج من قبل الفطر	57
1-4-5	بتأثير العوامل البيئية	57
2-4-5	بتأثير العوامل الكيميائية	58
3-4-5	تأثير منظمات النموالنباتية	58
	الاستنتاجات و التوصيات	60

	المصادر العربية	62
	المصادر الاجنبية	63

قائمة الجداول

ت	العنوان	ص
1	الفصل الثالث : الاجهزة المستخدمة	18
2	المواد الكيميائية	19
3	البادئ المستخدم في الدراسة	23
4	مواد تفاعل البلمرة المتسلسل	26
5	برناج جهاز البلمرة الحراري	27
6	تأثير مدة الحضن (يوم) و درجة الحرارة و التداخل بينهما في معدل النمو (سم) للفطر *S. sclerotiorum* على الوسط PDA و 5.6 pH	33
7	تأثير مدة الحضن (يوم) و درجة الحرارة و التداخل بينهما في انتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. Sclerotiorum* على وسط PDA و 5.6 pH	33
8	تأثير مدة الحضن (يوم) و مستوى الـ pH والتداخل بينهما في معدل نمو الفطر *S. sclerotiorum*(سم) على وسط الـPDA بدرجة حرارة 18± 2 مº	34
9	تأثير مدة الحضن (يوم) ومستوى الـ pH في انتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* النامي على وسط PDA بدرجة حرارة 18 ± 2 مº	35
10	تأثير مدة الحضن (يوم) ونوع الوسط الغذائي و التداخل بينهما في معدل نمو الفطر *S. sclerotiorum* عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و 5.6 pH	35
11	تأثير نوع الوسط المغذي و مدة الحضن (يوم) و التداخل بينهما في انتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* النامي بدرجة حرارة 18 ± 2 مº و 5.6 pH	36
12	تأثير مدة الحضن (يوم) وتركيز $(NH_4)_2SO_4$ و التداخل بينهما في معدل نمو الفطر *S. sclerotiorum* عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و 5.6 pH وعلى وسط PDA.	37

13	تأثير مدة الحضن و تركيز (NH4)2SO4 و التداخل بينهما في انتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* على وسط PDA عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و 5.6 pH	37
14	تأثير مدة الحضن (يوم)و تركيز $CaCO_3$ و التداخل بينهما في معدل النمو الفطر*S . sclerotiorum* عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و 5.6 pH وعلى وسط PDA	39
15	تأثير مدة الحضن (يوم) و تركيز $CaCO_3$ في انتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* على وسط PDA عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و pH 5.6	39
16	تأثير مدة حضن (يوم) و تركيز K_2SO_4 و التداخل بينهما في معدل نمو الفطر *S. sclerotiorum* عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و 5.6 pH وعلى وسط PDA	41
17	تأثير مدة حضن (يوم) و تركيز K_2SO_4 و التداخل بينهما في تخليق الاجسام الحجرية للفطر*S. sclerotiorum* على وسط PDA عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و رقم هيدروجيني 5.6	41
18	تأثير مدة الحضن (يوم) و تركيز حامض الجبريليك (GA_3) و التداخل بينهما في نمو الفطر *S. sclerotiorum* على وسط PDA عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و 5.6 pH	42
19	تأثير مدة الحضن (يوم) و تركيز حامض الجبريليك GA_3 ملغم /لتر و التداخل بينهما في انتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* على وسط PDA عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و 5.6 pH	43
20	تأثير مدة الحضن (يوم) وتركيز حامض الساليسيك (SA) ملغم / لتر و التداخل بينهما في نمو الفطر*S. sclerotiorum* على وسط PDA عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و 5.6 pH	45
21	تأثير مدة الحضن (يوم) وتركيز حامض الساليسيك (SA)ملغم / لتر و التداخل بينهمافي انتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* على وسط PDA عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و 5.6 pH	45
22	تأثير درجة الحرارة مº ونوع الوسط و الـ pHفي كمية حامض الاوكزاليك	47

	المنتج (ملغم) من قبل الفطر *S.sclerotiorum*	
23	تأثير نوع الملح و التركيز و التداخل بينهما في كمية الحامض ملغم المنتج من قبل الفطر *S. sclerotiorum* عند درجة حرارة 18 ± 2 ºم و 5.6 pH	48
24	تأثير نوع منظم النمو والتركيز (ملغم / لتر) و التداخل بينهما في كمية الحامض المنتج (ملغم) من قبل الفطر *S. sclerotiorum* على وسط الـ PDAعند درجة حرارة18± 2ºم و 5.6 pH	49

الفصل الاول

المقدمة : Introduction

اكتشف الفطر *Sclerotinia*من قبل العالم Liebert عام 1837 و يعد هذا الجنس من الاجناس المهمة اقتصاديا،إذ يضم العديد من الانواع التي لها القدرة على اصابة المحاصيل النباتية وبمديات واسعة على العوائل النباتية المختلفة، و في مختلف انحاء العالم، و بإمكان هذه الانواع ان تغزوا المحاصيل النباتية في الحقل او المحاصيل المخزنة على حد سواء (Purdy،1979؛Kora و اخرون ، 2003 ؛Matheronو Porchas، 2005).

تمتلك الانواع التابعة للجنس.*Sclerotinia*spp عدداً من الوسائلو الالياتفضلا عن التكيفات الفسيولوجية والتي تساعده على البقاء و الانتشار و التطور وعلى المدى البعيد (من موسم لاخر ومن سنة لاخرى) ، وتختلف هذه الوسائل من بيئة لاخرى ومن ظرف لأخر فهي تتراوح بين تكوين الابواغ الجنسية sexual spores و الاجسام الحجريةSclerotia(Webster و Weber ، 2007). تعد الاجسام الحجرية للفطر (.lib)*Sclerotiniasclerotiorum* debary من اهم الوسائل التي يستخدمها الفطر في الدفاع عن النوع إذتستطيع البقاء في حالة سبات لمدة طويلة تحت الظروف غير المناسبة للانبات و النمو (Dickmanو Rollins، 2001).يتم انبات هذه الاجسام عبر تكوين الغزول الفطرية Mycelium مباشرة، او من خلال تكوين الابواغ الكيسيةAscospores والتي تمثل الابواغ الجنسية للفطر و احد الخصائص التشخيصية للفطر وهي سهلة الانتشار واصابة النباتات ولهذا فلها دورٌ مهمٌ في وبائية الفطر(Webster و Weber ، 2007). و توجدعواملعدة تؤثر في حيوية الاجسام الحجرية وقدرتها على الانبات و التجديد واهمها الاحياءالمجهرية الموجودة في التربة ،الرطوبة ، الحرارة وكذلك وجد ان اضافة الاسمدة العضوية و النيتروجينية يزيد من تحلل تلك الاجسام الحجرية ،كذلك فان استخدام البسترة الشمسية يعجل في تحلل الاجسام الحجرية وزيادة الاحياء المجهرية المفيدة للنبات (محمد ،2001).

ينتشر الفطر *Sclerotinia*s pp في معظم انحاء العالم وخاصة في التربة او البقايا النباتية بشكل اجسام حجرية او يكون الفطر مترمماً داخل الانسجة النباتية المصابة (Ayers و Adams، 1981).

اعتمدت الخصائص المظهرية و التراكيب المجهرية في تشخيص هذا الفطر و الانواع التابعة له اذ تشمل هذه الخصائص لون المستعمرة وشكلها و قابليتها على التصبغوكذلك اعتماد الصفات التكاثرية كنوع الابواغ و الاكياس البوغية و نوعها وشكلها و شكل وحجم الاجسام الحجرية المنتجة (Kohn،1979 ;و Smith،1991). ولكن هذه الصفات هي صفات غير مستقرة و قابلة للتغير بتغير الظروف البيئية كذلك تتطلب جهد ووقت كبيرين ،فضلاً عن ظهور سلالات متغايرة ضمن النوع الواحد لذا اتجهت الدراسات في الاونة الاخيرة الى الاعتماد

على التشخيص الجزيئي والذي يستند الى تقنية Polymerase Chain reaction(PCR)و التي تتميز بسرعتها في اعطاء النتائج و دقتها المتناهية في التشخيص (Curran واخرون، 1994 Noonan; و اخرون،1996)..

يتأثر نمو و معدل تجرثم الفطر بتغير الظروف البيئية ،اذ وجد ان نمو الغزل الفطري يكون في افضل حالاته عند مستوى حرارة يتراوح بين 15-20ºم،و ينخفض معدل النمو كلما ارتفعت درجة الحرارة،ويمكن ان تؤثر في انتاج الاجسام الحجرية او يؤدي الى تكوين اجسام حجرية مشوهه غير قادرة على الانبات و التجديد (محمد ، 2001 Mila ;و Yang، 2007) . يمتلك الفطر مدى واسعاً من الرقم الهيدروجيني و الذي قد يصل من 3.0 - 9.0،ويفضل الفطر *S.sclerotiorum*الوسط الحامضي 4.0- 5.5 (Agnihotri و Rai،1971) . واشارت عدد من الدراسات الى ان اختلاف نوع الوسط الغذائي ومصدر الكاربون الذي يحصل عليه الفطر يمكن ان يلعب دورا في التقليل من حيوية الفطر ،اذ ذكر كل من Agnihotri و Rai،(1971)وWangواخرون،(1971) ،ان الوسط المفضل هو اكار دكستروز البطاطا PDA و ان كل من D – Glucose وD-Mannose الاحاديين يعطيان افضل نمو وافضل انتاج للاجسام الحجرية .ويمكنالاشارة الى دور بعض الاملاح اللاعضوية الموجودة في التربة في تثبيط تخليق الاجسام الحجرية من قبل الفطر لما لها تأثير في الجهد الاوزموزي و الكهربائية في التربة و هي عوامل تؤثر في حيوية الفطر من جهة و في العمليات الحيوية للنبات من جهة اخرى، فقد تزيد او تقلل من قدرة النبات على المقاومة (Hassan و Shahzad، 2004).

ويبقى الدور الذي تقوم به منظمات النمو النباتية في مقاومة الامراض غير واضح بشكل كامل ،ولكن هناك بعض الاشارات الى امكانية استخدام Naphthalene acetic acid (NAA)كعامل مضاد للنمو الفطري ، فيما اشارت بعض الدراسات الى قدرة الاوكسينات Auxinsعلى تثبيط النمو الخضري للفطر *Fusarium culmorum*و تجرثمه في المختبر ، وكذلك قدرة حامض الأبسيسيك(ABA) Absci-sic acid على مكافحة اللفحة المبكرة early blight على نبات البطاطا المتسببة عن فطر *Alternariasolani*(Elad، 1995)، كذلك دورها في الحد من امراضية الفطر *S.sclerotiorum* على النبات ومكافحة مرض التعفن الابيض على نباتي الفاصوليا و الخيار في المختبر(Al-Masriو اخرون ، 2002) .

ويعد حامض الاوكزاليك Oxalic acidالذي ينتج من قبل الفطر*S.sclerotiorum*وفطريات اخرى ممرضة للنبات عاملاً اساسياً في تحديد امراضية الفطر ،وبينMarciano و اخرون(1983)، ان هذا الحامض يساهم في خفض الـpH للنسيج

النباتي مما يؤدي الى تنشيط عدد من الانزيمات المحللة للجدار الخلوي ومنها انزيم galacturonase,exo-pectinase, cellulase,hemicellulase وprotease،فضلاً في عمله كمركب مخلبي chelationلايون Ca^{2+} المهم في بناء الجدار الخلوي اضافة الى السمية التي يمكن ان يسببها على النبات بشكل مباشر بفعل الخاصية الحامضية التي يمتلكها(Bateman و Beer، 1965). ويمكن القول ان انتاج هذا الحامض يتأثر بالعوامل المؤثرة في حيوية الفطرفهو يتأثر بنوع المصدر الكاربوني المستخدم و درجة الحرارة و درجة الحموضة و العوامل الكيميائية (Micales، 1995). و لقلة الدراسات المتوفرة في هذا المجال ولغرض تسليط الضوء على هذا الفطر الممرض للنبات فقد هدفت الدراسة الى ما يأتي :

تحديد اهم السلالات الممرضة للفطر *S. sclerotiorum* وامكانية تشخيصها باستخدام تقانة الـPCR و ايجاد العوامل البيئية و الكيميائية التي يمكن ان تقلل من ضراوة الفطر و امراضيته. من خلال المحاور التالية :

1- استخدام تقانة الـPolymerase Chain reaction(PCR)في تشخيص السلالة التابعة للفطر *S. sclerotiorum*

2- دراسة تأثير بعض العوامل البيئية من درجة الحرارة و مستوى الـ pHو نوع الوسط الغذائي في معدل النمو الفطر*S. sclerotiorum* و انتاجه للاجسام الحجرية.

3- دراسة بعض العوامل الكيميائية و منظمات النمو النباتية و تأثيرها في معدل نمو الفطر *S. sclerotiorum* و انتاجه للاجسام الحجرية.

4- تقدير الكمية المنتجة من حامض الاوكزاليك Oxalic aidc من قبل الفطر *S. sclerotiorum* تحت تأثير العوامل البيئية و الوسط الغذائي و العوامل الكيميائية المذكورة اعلاه.

الفصل الثاني

استعراض المراجع Literature Review

1-2 - الفطر *Sclerotinia* spp. وحياتيته:-

يعد الفطر *Sclerotinia*من الفطريات التي تسجل انتشارا واسعا ولها القدرة على اصابة المحاصيل النباتية ،اذ يصيب هذا الفطر اكثر من 400 نوعاً نباتياً مختلفاً حول العالم و يمكن ان نشير الى اكثر من 60 مرضاً نباتياً متسبباً هذا الفطر، مثل التعفن القطني Cottony Rot، و التعفن الطري و الجافDry& Soft Rot ، و التعفن التاجي Crown Rot ،ولفحة الازهار Blossom Blight والتعفن الابيضWhite Mouldفضلاً عن امراض التنخرات واصابات السيقان و الاوراق .و تكون الانواع التابعة لجنس *Sclerotinia* ذات شكل مظهري متقارب جدا وفي بعض الاحيان لا يمكن التمييز بينها إلا من خلال استخدام صفات تشخيصية دقيقة او عن طريق تحليل المادة الوراثية DNA ومن انوعه *S. trifoliorum*،*S.minor*، *S.fructicola*،*S.homoeocarpa* و *S. sclerotiorum* و الذي يعد الاكثر شيوعا من بين الانواع الاخرى (Bolton و اخرون، 2006).

و قد اختلف العلماء في تصنيف الفطر *S. sclerotiorum* قديما اذ يعد Liebert اول من وصف جنس *Peziza sclerotiorum* عام 1837 م، ولكن Fuckel عام 1870 م كان قد ذكر التسمية *Sclerotinia*و ابقى على تسمية Liebert مع ابتكار تسمية ثنائية جديدة هي *Sclerotinia libertiana*، في حين ان De Bary اول من اشار في اعماله الى الاسم الثنائي *Sclerotinia sclerotiorum* عام 1884 م، لذلك يشار الى الفطر دائما بالتسمية التالية *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) De Bary اشارةً الى العالمين السابقين (Purdy، 1979).

وقد بيّن Dohrooو Cuong،(2006)ان الفطر يعود تصنيفيا الى عائلة Sclerotiniaceae و التي تعود الى رتبة Helotiales و هي احد عوائل مجموعة الفطريات القرصية Discomycetes ضمن صنف الفطريات الكيسية Ascomycetesاذ ان هذا التصنيف يستند الى التصنيف الذي ذكره Khon ،(1979)الذي لا يزال معتمدا حتى الان.

تستند معظم الاسس التصنيفية الى الخصائص المظهرية العامة، والى الاجسام الحجرية، و الثمرية، و الاكياس، و الابواغ الكيسية، ولكن توجد عدد من الاختلافات التي لايمكن تحديدها بالاعتماد على التشخيص المظهري اذ يمكن ان تختلف العشائر الوراثية و السلالات Strains فيما بينها من حيث قدرتها الامراضية على النبات، وكذلك ضراوة هذه السلالة الممرضة والتي هي تمثل القدرة على احداث الضرر المميت بالعائل او اتلافه بالشكل الكامل،كما يمكن معرفته من خلال عدد من المركبات الكيميائية المنتجة من قبل الفطر كحامض الاوكزاليك، وعدد من

الأنزيمات المحللة للجدران الخلوية للنبات مثل البكتينيز Exo-Pectinase و البروتييزProteaseاذ يكون البعض شديد الضراوة على بعض العوائل النباتية، وغير فعال على عوائل اخرى(Cessna و اخرون ،2000 ؛Noonan و اخرون ، 1996).

يعد الطور الجنسي و الخضري من اهم الاسس التي يعتمد عليها في التشخيص، و التصنيف المظهري،اذ يتكون الطور الجنسي للفطر من الابواغ الجنسية الكيسية Ascospore التي توجد داخل اكياس Asciوتنشأ هذه الاكياس في اجسام ثمرية كأسية الشكل Apothecia محمولة على سويق Stipe تنشأ الساق من نسيج حشوي فطري Stromata .ويبدأ تكوين القمع السبوري Apothecia من النسيج الفطري المتكون في فصل الربيع و اواخر الشتاء (Webster و Weber، 2007). و يتكون من الانبات الجنسي Carpogenic Germination للاجسام الحجرية الموجودة في التربة وهذا يكون شائع الحدوث في الطبيعة بشكل عام (Hawthorne،1975). ويتأثر انتاج الجسم الاثماري 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 هاماًفي انتاج ونمو الجسم الاثماري (Clarksonو اخرون ، 2004).و يبدأ تكوين الاجسام الثمرية من خلال تكوين نتوء صغير يبرز من سطح الجسم الحجري و الذي ينشأ اساسا من طبقة القشرة Cortex، او اللب Medullaفي الجسم الحجري، او النسيج الفطري يستمر بالنمو ليكون بشكل هايفات متشابكة تحتوي المناطق الفعالة منها على سايتوبلازم كثيف مكونة ما يعرف بالسويق Stipe والذي يحمل في نهايته تركيب قمعي الشكل يدعى Apothecim ذو طبقة داخلية خصيبة تسمى Hymenium Layerو تحتوي الاكياس البوغية Asci، و التي يحتوي كل منها على ثمانية ابواغ جنسية كيسية(AscosporeLetuorneau، 1979).

تحتوي الابواغ الكيسيةفي داخلها على نواتين 2Nucleiفي كل بوغ ، اما العدد الكروموسومي المفرد Haploid فهو مكون من ست كروموسوماتChromosomes مفردة (Wong و Willetts، 1979).ويكون الطور الخضري عبارة عن غزل فطريMyceliumمكون من هايفاتمقسمةSpetate Hyphaeبحواجز حقيقيةتظهر بشكل ابيض قطني على المادة الغذائية (وسط النمو في المختبر) او على النبات العائل في منطقة الاصابة ثم يبدأ الغزل الفطري بالتحول الى الاجسام الحجرية Sclerotiaوالتي تكون ذات لون ابيض في بادئ الامر ثم ما تلبث ان تتحول الى اللون الاسود تدريجيا بعد مرور فترة من النمو تطول او

تقصر هذه الفترة اعتمادا على توفر الغذاء و العوامل البيئية المحيطة (Saharan و Mehta، 2008؛ Kohn ، 1979).

في الدراسة الجزيئية للفطر Molecular Trais والتي تعنى بدراسته على المستوى الوراثي ودراسة الحامض النووي الرايبوزيDNAلغرض التشخيص الدقيق وتحديد السلالة الممرضة فيه اذ تتم من خلالبعض عوامل الصفات الوراثية فضلاً عنDNA مثل التوافق الذاتي لمجاميع الغزول الفطريةMycelial Compatibility Groups. ويمتلك فطر *S. sclerotiorum* تنوعاً وراثياً وجزيئياً واضحاً يمكن دراسته باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة Polymerase Chein Reaction (PCR). وبينMalvarezو اخرون(2007)من خلال دراسته للفطر المستوطن على الخضار في شرق الولايات المتحدة ولاربع مدن مختلفة،إن العزلات التي تم جمعها(294 عزله) ذات طراز مظهري متشابه،ولكن عند التحليل الوراثي و الجزيئي وتحديدا التتابع الوراثي للمنطقة المعروفة باسم Intergenic spacer (IGS) regionوالتي استخدمت لتشخيص النوع الفطري وكذلك استخدم التتابعين A1 و A2 لتحديد التغاير بين السلالات المتداخلة. اذتبين انها تنتمي الى اربعة من العشائر الوراثيةPopulationsالمختلفة و هذه العشائرلا تمتلك بصمة وراثية مشتركة فيما بينها.كما اوضحSafaie و اخرون(2011) من خلال دراسة عدد من العزلات للفطر(38 عزله) و على مستوى العشيرة populationو التي تعود الى السلالة المعروفة باسم MCGوسلالاتين اخرى غير معروفة (غير مشخصة) في ايران، و من خلال دراسة الجينات للتتابعات الجينية (h , I , PPB) و التي اظهرت تغاير بالنسب بين السلالات المختلفةاذ كانت النتائج متباينة($h = 0.291, I = 0.429, PPB = 75.21$)وباستخدام تقانة Repetitive-PCR(Rep – PCR)أن التغاير الوراثي واضح بين السلالات المختلفة و بين كذلك انه قد ينشأ التغاير الوراثي ضمن السلالة الواحدة نفسها بفعل عدد من العوامل كالهجرة Immigration ، الطفرة Mutation ، الانتخاب التفاضليDiversifying Selection وكذلك من خلال التكاثر الجنسي Sexual Reproduction الذي يمكن ان يحصل مع افراد اخرى متغايرة وراثيا. وفي دراسة اخرى للباحثنفسه (2012) التي جمع فيها (57) عزلة من 300 نباتاً مصاب ضمن ثلاث مناطق جغرافية مختلفة متجاورة تبين انها لا تعود بالضرورة الى الطراز الوراثي نفسه وكذلك ان التغاير كان موجوداً ضمن المنطقة الجغرافية الواحدة اذ ان 39 عزله كانت تعود الى ذات السلالة (MCG) التي كانت غير مشتركة ضمن المناطق الثلاث اذ كانت متمركزة ضمن موقع جغرافي واحد. وقد فسر الباحث هذا الى عدم وجود تداخل بيئي وجغرافي ،وكذلك وجود عدد من الحواجز

البيئية و الوراثية، وقد يكون عدد العزلات قليلاً و غير كافياً و لم يغط المناطق الثلاث بشكل كامل، فضلاًعن دور العوامل البيئية (Safaie و اخرون، 2012).

تعد الابواغ الكيسية اهم وسائل انتشار الفطر من حقل الى اخر عن طريق الرياح ، و تنبت الابواغ الكيسية حين توفر الظروف الملائمة لتعطي غزول فطرية Mycelium ذات لون ابيض تقضي فصل الشتاء البارد على سطح النبات العائل كطور خضري للفطر ثم ما يلبث ان يتحول الى أجسام حجرية عند نهاية فصل النمو اذ تبقى هذه الأجسام في التربة لحين انباتها من جديد في موسم النمو التالي،كما يمكن ان ينتقل الفطر بفعل الأجسام الحجرية الموجود في التربة الملتصقة بالبادرات و المعدات الزراعية الملوثةويكون انباتها انباتا جنسيا Carpogenic Germinationاذ يبدأ بتكوين السويق Stipe و الذي ينمو ليعطي الجسم الاثماريApotheciumالتي تحتوي على الابواغ الكيسية Ascospores و التي تنتشر على العائل لتحدث الاصابة من جديد وتعيد دورة حياة الفطر و قد يكون انبات الاجسام الحجرية انباتاً خضرياًلتعطي غزل فطري بشكل مباشر و يسمى انباتها في هذه الحالة Myceliogenic Germination (Agrios و اخرون 1997 ؛Amselemو اخرون، 2011).

تعد الاجسام الحجرية من اهم وسائل البقاء في الفطريات من خلال قدرتها على تحمل الظروف غير الملائمة فضلاً عن قدرتها على التجديد و النمو حتى بعد مرور مدة طويلة على بقائها في التربة وتنتج الاجسام الحجرية من قبل العديد من الانواع و الاجناس الفطريةمثل*S.sclerotiorum* ،*Sclerotium*sppو*Rhizoctonia*spp وبعض الانواع التابعة لجنسالفطر *Aspergillus*spp(Gue و اخرون، 2004). و الاجسام الحجرية هي عبارة عن تراكيب سوداء صلبة متعددة الغزول الفطرية Multihyphal Structure مختلفة في النوع و الحجم و الشكل من جنس لاخر ومن نوع لاخر ضمن الجنس نفسهتلعب دورا مهماً في بقاء الفطرو انتشاره (Dickman و Rollins ، 2001).

وتميز الاجسام الحجرية للفطر*S. sclerotiorum*الطبقة الخارجية Cortexذات الون الاسود بسبب تراكم صبغة الميلانين وهي مايعطي الاجسام الحجرية القدرة على مقاومة الظروف البيئية المعادية ،فيما يكون نسبتها اقل في الطبقة التالية والتي تعرفبالـ Rind اما الطبقة الداخلية اللب Medullaفهي تتكون من خلايا زجاجية شفافة تخلو من صبغةالميلانين بشكل تام(Butler و اخرون، 2009).ويمكن تمييز نوعين من الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*وهي النوع الاعتيادي الشائع ذو اللون الاسود، و النوع الطارئ ذو اللون البني

ويكون اقل صلابةمن النوع الاخر (Saharan و Mehta، 2008). اما مراحل تكوين الاجسام الحجرية فتكون على ثلاثة مراحل ابتداءً بالبادئات Intiation والتي وتتضمن تجمع الهايفات بشكل متقطع و في هذه المرحلة يبدأ بناء الميلانين وتكون الاجسام في هذه المرحلة ذات لون ابيض.ثم التطور Developmentوالتي فيها يستمر نمو الهايفاتوتستمر بالتجمع ويزداد حجم الجسم الحجري بشكل ملحوظ مع وجود اكياس مملوءة بالسائل على سطح الجسم الحجري ويكون اللون متدرج من الابيض الى اخضر بني.واخيرا النضج Maturationوهي المرحلة التي يتوقف فيها الجسم الحجري عن النمو وتتراكم صبغة الميلانين بشكل تام على خلايا الطبقة المحيطية ويتصلب السطح الخارجي بشكل تام ويكون ذو لون بني مائل للاسود (Dickman و Rollins ، 2001).

يشيرالبعض ،الى ان الانبات المباشر للاجسام الحجرية للفطر*S.sclerotiorum*على العائل يكون نادر الحدوث في الطبيعة ويحدث نتيجة لانخفاض مستوى الطاقة الداخلي في الجسم الحجري (Abawi و Grogan، 1975).ويوجد ثلاثة انواع من الانبات في الاجسام الحجرية اثنان منها لا جنسي (خضري) وهما Eruptive germination الذي يحدث بسبب تكون عدد من الهايفات المتجمعة بشكل كثيف تؤدي الى حدوث انتفاخ او تورم في طبقة الـ Rind للجسم الحجري ثم تمزقها و خروج الهايفات ويكون هذا النوع من الانبات شائعاً في جنسي *S.sclerotiorum*و*S. minor* (Chang و Huang،2003).اما النوع الاخر Hyphal Germination فهو يبدأ بتكوينهايفا الانبات Germinative Hyphae و التي تبدأ من المنطقة الداخلية للجسم الحجري وتمر خلال منطقة اللب الخارجيOuter Medullaryومن ثم القشرة لتبرز من الجسم الحجري و تتجمع في الخارج مكونة الغزل الفطري وهذا النوع من الانبات يوجد في كل من الفطر *S. minor* و الفطر *Sclertium rolifsi*(Bullock و Willetts، 1996).

اما النوع الثالث فهو انبات جنسي يعرف باسم Carpogenic germination وهو يؤدي الى تكوين الاجسام الثمرية الحاوية على الابواغ الجنسية (Le tuorneau، 1979).

2-2 -العوامل البيئية والكيميائية المؤثرة في نمو الفطروانتاجه للاجسام الحجرية:

2-2-1- درجة الحرارة Temperature:

ينمو الفطر *S.sclerotiorum* بدرجات حرارية تتراوح بين 10- 20°م , وهي تمثل الدرجة المفضلة للنمو و احداث الاصابة على النبات وكذلك تكوين الاجسام الحجرية(Mila و

2007،Yang).و ذكرLanoiseletو اخرون ،(2005) انالاجسام الحجرية للفطر *S.sclerotiorum*تمتلك القدرة على تحمل مديات حرارية عالية تصل الى 121° م ،وان لها القدرة على الانبات والتجديد عبر تكوين الغزل الفطريmyceliumاو من خلال تكوين القمع البوغيApothecium بشكل طبيعي عند انخفاض درجات الحرارة ،وتعتبر درجة الحرارة 4-8 °مهي المفضلة لانتاجالقمع البوغي(Mila و Yang،2007 ؛ محمد ،2001). كما وان الابواغ الكيسيةAcsosporeيمكن ان تنبت في مدى يتراوح بين 4-25 ° م او في ظروف حرارية يمكن ان تصل ايضا الى اقل من 4 °م (Partridge و اخرون، 2006). ان ارتفاع الحرارة في التربة الى 60 ° ممع وجود اليوريا يؤدي الى انتاج اجسام حجرية مشوهة و غير قادرة على الانبات و التجديد (محمد ، 2001).

2-2-2-الأس الهيدروجيني pH:

ان الفطر *S.sclerotiorum*له القدرة على النمو، و انتاج الاجسام الحجرية ضمن مدى واسع من الـpH(محمد ، 2001). وذكرAgnihotriو Rai ،(1971) ،في دراستهما لمستوياتمتعددة من الـpH وعلى انواع متعددة من الاوساط المغذية ، ان الفطر له القدرة على النمو و انتاج اجسام حجرية قادرة على التجديد ضمن مديات مختلفة تتراوح من 3.5- 9.0 ولكنيعد المدى الحامضي 4.1-5.5هو المدى المفضل لنمو الفطر وانتاجهللاجسام الحجرية .واوضحDickmanوRollins،(2001) ، دور الحامضية في تحديد ضراوةالفطر من خلال دور حامض الاوكزاليكoxalic acid الذي يوفر بيئة ملائمة لعمل الانزيمات الضرورية لامراضية الفطر على النبات.

2-2-3- شدة الاضاءة وطول مدة الضوء Lightingand light density:

يعد الضوء عاملا هاما في نمو الكثير من الانواع الفطرية وتجرثمها مثل *Fusarium*spp وأن معدل تجرثم و انتاج الاجسام الثمرية للفطر *Fusarium* sppيزداد بشكل عالي عند معدل اضاءة مستمر، او متقطع، و قد يصل الى اقل مستوى له عند الظلام المستمر (2007،Chavan). كما اشارClarkson و اخرون،(2004) الى دور فترة الاضاءة وتأثيرها في انتاج الاجسام الثمريةApothecia، واطلاق الابواغ الكيسية للفطر*S. sclerotiorum*اذ بلغ معدل اطلاق الابواغ الى مايقارب 100-1600 بوغاً لكل جسم ثمري عند مدة اضاءة مستمرة

ولمدة 72 ساعة عند درجة حرارة 15° م ، فيما انخفض معدل اطلاق الابواغ عند الظلام المستمر وتحت الظروفنفسها الى 10-316 بوغ لكل جسم حجري مقارنةً الى 100- 1600 بوغ عند فترات طبيعية من الضوء و الضلام (12 ساعة ضوء ، 12 ساعةظلام) .

2-2- 4- نوع الوسط الغذائي : Type of cultures media

يعد الوسط الغذائي عاملاً مهماً في التأثير في نمو الفطريات ونشاطها وتوجد عدة انواع مستعملة في تنمية الفطرياتو تشخيصها،اذ ان بعض الفطريات تظهر تغايرا واضحا في الخواص المظهرية من وسط الى وسط اخر وتأتي اهمية دراسة الوسط الغذائي من معرفة متطلبات النمو الخاصة بالفطر وكذلك فهم العلاقة بين الفطر المتطفل و العائل الذي ينمو عليه (Tanrikut و Vaughan، 1951). و من خلال الدراسة التي اجراها كل منAgnihotri و Rai(1971) على الفطر *S. sclerotiorum* وعلى عدد من الاوساطالمختلفةومنها وسط بطاطا دكستروز اكار PDA و وسط ريتشارد Richard's Mediumو وسط براونMedia Brown'sوجد ان هنالك اختلافا واضحا في معدلات النمو للغزل الفطري وكذلك انتاج الاجسام الحجرية،و كان معدل النمو على الاوساط المذكورة هو 9.0 ، 7.5 و 5.2 سم على التوالي كذلك وجد أن هناك اختلاف في عدد الاجسام المنتجة على كل وسط و الذي بلغ 18، 25 و 12 هذا فضلا عن الاختلاف في حجم الاجسام الحجرية .اماWang و اخرون ،(1971)فقد درسا تأثير انواع مختلفة من مصادر الكاربون وعند تراكيز مختلفة في الوسط الغذائي في نمو الفطر، ومعدل تخليق الاجسام الحجرية في الوسط وقد وجد ان نمو الغزل الفطري يصل الى اعلى معدل له عند استخدام د- الكلوكوز D - Glucose و د- المانوزD-Mannoseفيما ينخفض تدريجيا ويصل الى اقل مستوياته عند استخدام سكريL-Sorbose و L-Xylose.

وقد اوضح Mohamed،(2001) في دراسته لعدد من العوامل المؤثرة في تغاير الفطر *S. sclerotiorum* ، ان الاوساط الزرعية كان لها تأثيرا واضحافي النمو لاربع سلالات مختلفة،S1, S2, S3,S4اذ بين ان وسط البطاطا دكستروزاكارPDA هو الوسط الافضل لنمو جميع العزلات المدروسة متفوقا على كل الاوساط قيد الدراسة، كما وتبين من الدراسة ان السلالتين S2 و S4 كانتا افضل نموا من S1 و S3 عند اختلاف الوسط كما بين ان كل من وسط الخميرة دكستروز اكار (YDA) Yeast Dextrose Agar، و وسط الاكار المغذيNutrient Agar (NA)كانا مناسبين بالنسبة للسلالات المختلفة على حد سواء فيما كان

الوسط Patato Agar (PA)هو الاقل تفضيلا،في الوقت الذي لم تظهر العزلات المدروسة أي استجابة في النمو للوسط Gliotoxin Fermentation Media (GFM) .

2-2-5- تأثير مستويات الملوحة والعناصر المغذية:

تمثل الاملاح الموجودة في التربة احد اهم العوامل المغذية للنبات وكذلك تلعب دورا واضحا في تحديد القدرة الامراضيةللاحياء المجهرية التي تهاجم النبات من خلال تأثيرها في حيوية النبات من جهة و تأثيرها في حيوية الكائن الممرض من جهة اخرى، فقد وجد ان الاجهاد الملحي على النبات يمكن ان يؤدي الى تحفيز الاصابة ببعض الفطريات الممرضة مثل *Phytopthora*sp وكذلك الفطر *Pythium*sp وذلك من خلال استجابة ابواغ الفطر الى الذائبات التي يطرحها النبات لمعادلة جهده الاوزموزي (Johal،1984). ومن هذه الاملاح هي ملح NaCl، اذ اوضح كل منHassan وShahzad،(2004) في دراستهما لتأثير ملح NaClعلى الفطر *S. Sclerotiorum*ان التراكيز العالي من الملح (10^5ملغم/لتر) تؤدي بشكل ملحوظ الى تثبيط تكوين الاجسام الحجرية للفطر، فيما لا يوجد تأثيرا كبيرا او مباشرا في نمو الغزل الفطري للفطر . ومن خلال ما درسهAhariو اخرون،(2008) ،في دور الايونات الموجبة مثل Ca^{2+} و Zn^{2+} المنتجة من قبل بعض الاحياء المجهرية الموجودة في التربة و التي لها قدرة عالية في تثبيط الغزل الفطري وانبات الاجسام الحجرية للفطر وكذلك عند اضافة ايونات الكالسيوم بشكل املاح مائية $CaCl_2. 2H_2O$،اظهرت قدرة معنوية في تقليل نسبة اصابة النبات بالفطر في الوقت الذي لم تؤثر ايونات Zn^{2+} المضافة لوحدها وقد فسر هذا من خلال الدور الذي تؤديه هذه الايونات في عمل الانزيمات المنتجة من قبل الاحياء الموجودة في التربة.

اماErper و اخرون،(2011) ،الذين درسوا تأثير املاح كاربونات البوتاسيوم الهيدروجينية$KHCO_3$ على ثلاثة اجناس فطرية مختلفة *S.sclerotiorum* ، *Rhizoctoniasolani*و الفطر *Trichodermasp.*فقد ذكروا ان نمو الغزل الفطري للفطريات الممرضة المدروسة*Rhizoctoniasolani*و *S. sclerotiorum* يتأثر كلما زاد تركيز الاملاح المضافة الى الوسط حتى يصل الى اقل معدل نمو عند التراكيز العالية 75 و100 mM بعد فترة حضانة تصل الى 72 ساعة. وكذلك يمكن ان تؤثر على الفطر من خلال فعاليتها المضادة لبناء الاجسام الحجرية للفطر*S. sclerotiorum*والذي كان لها دورا كبيرافي تثبيط انتاج الاجسام الحجرية و اختزال عددها حتى عند التراكيز الاقل .

2-2-6- دوربعض منظمات النمو النباتية(PGRs):

تشير الدلائل الى قدرة كلا من الفطر الممرض، و النبات في بناء منظمات النمو ، وهي تزداد عند حدوث تفاعل بين الممرض، و العائل، او عند حدوث مقاومة النبات للفطر الممرض، كذلك يمكن استعمال Naphthalene Acetic Acid (NAA)كعامل مضاد للنمو الفطري،و اشارت بعض الدراسات الى قدرة الاوكسيناتAuxins على تثبيط النمو الخضري و تجرثم الفطر *Fusarium culmorum* في المختبر ، وكذلك قدرة حامض الأبسيسيك Absci-sic Acid (ABA) على مكافحة اللفحة المبكرة Early Blight على نبات البطاطا المتسببة عن فطر*Alternaria solani*(Elad، 1995) .يعد حامض الجبرليك GibberellicAcid (GA_3)،احد اهم منظمات النمو النباتية التي يمكن ان تنتج من قبل الفطريات الموجودة في التربة و المتعايشة مع النبات كناتج ايضي ثانوي وقد تم عزل هذا المركب لاول مرة من فطر *Gibberellafujikuroi*من قبل العالم T. yabuta ويوجد هذا المركب بعدة اشكال مثل GA_1 GA_3, GA_2,ويعد المركب GA_3 هو الاكثر شيوعا بينها ،ويعتبر من المركبات الواسعة الانتشار في المملكة النباتية بشكل عام،فضلاً عن اهمية هذا المركب في العمليات الحيوية للنبات فقد استخدم كعامل مضاد لبعض المسببات المرضية ،فبينت الدراسات قدرته على الحد من تجرثم الفطر*Clavicepspurpurea*المسبب لمرض الاركوتErgotعلى بعض اجناس العائلة النجيلية(Evans، 1984). وكذلك اختبرت فاعليته ضد الفطر*S. sclerotiorum* عند دراسة مرض التعفن الابيض White mouldاذ اظهر تأثيراً مباشراً في مكافحة المرض عند اضافته الى الفطر بنفس التراكيز التي يضاف بها للنبات (Al-Masri و اخرون، 2002).

اما حامض السلساليك(SA) Salicylic Acid فيعد احد الهورمونات النباتية و التي تنتج بشكل طبيعي في النبات و بكميات ضئيلة جدا وتشير عدد من الدراسات الى الدور الذي يقوم به هذا المركب في تحفير ما يعرف بنظام المقاومة المكتسبة في النبات (SAR) Systemic acquired resistance وكذلك الاستجابة الدفاعية للنبات ضد الاحياء الممرضة التي تهاجم النبات (Yalpani و Raskin، 1993 ؛Ryals و اخرون، 1996). و بينHadi و Balali،(2010)،ان لهذا الحامض قدرة على اختزال الاعراض المصاحبة للاصابة بفطر *Rizoctoniasolani* على نبات البطاطا و هي الاجسام الحجرية الموجودة على سطح الدرناتوبنسبة 73 % وكذلك لاحظا ان شدة الاصابة تقل عند معاملة النبات بتراكيز الاعلى من 0.05mM من هذا المركب حتى تختفي تدريجيا عند الوصول الى التركيز0.2mM ،اما Hilal و اخرون،(2006) فقد اشاروا الى دور كل من Chitosanو Salicylic acid في مكافحة كل مرض سقوط البادرات وتعفن السيقان الناتج من الاصابة بفطر*S. sclerotiorum* ،اذ ان

البادرات التي عوملت بخمسة تراكيز من حامض السلساليك استخدمت في الدراسة 200- 250- 500- 1000- 1500 ملغم / لتر،اظهرت قدرة على مقاومة الفطر وكذلك عند اضافة الحامض الى الوسط النامي عليه الفطر في المختبر اظهر قدرته على تثبيط نمو الفطر و بشكل يتناسب مع زيادة التركيز.

3-2 حامض الاوكزاليك Oxalic acidكعامل ضراوة للفطر :

يوجد حامض الاوكزاليك في معظم الكائنات الحية كالفطريات ، النباتات ، الحيوانات و الاحياء المجهرية الدقيقة ايضا ، ويحدث بناء هذا المركب في كل الاغشية الحية للمجاميع الحية، ويوجد اما بشكل حر، او بشكل املاح الكالسيوم، وهذه هي الحالة التي تكون الاكثر شيوعاً، او بشكل املاح البوتاسيوم واحيانا الصوديوم، وتظهر الاحياء مستويات مختلفة من محتوى الاوكزالات ما بينها،وحتى ما بين انواع الجنس الواحد.يعد حامض الاوكزاليك هو احد اكثر الاحماض العضوية القوية شيوعا اذ ان قيمة pka(قيمة الاس الحامضي) له تتراوح ما بين 1.3 الى 4.3 (Calişkan،2000).وتنتج بعض الانواع الفطرية المتطفلة على النباتات هذا الحامض بكميات كبيرة على النبات مما يؤدي الى انخفاض قيمة الرقم الهيدروجيني بشكل كبير وهذا ما يسمح للفطر باختراق النبات بسهولة بالغة (Micales، 1995). وتشير الدراسات، الى ان بناء الاحماض العضوية ومنها حامض الاوكزاليك غالبا ما يكون مرافقا لايضالكاربوهيدراتCarbohydrate في الكائنات الحية و لعملية البناء الضوئي photosynthesisفي النبات (Calişkan، 2000).

وتمر عملية بناء هذا الحامض بمساراتايضية ضخمة و التي يعد فيها كل من حامض الاسكوربيكL-ascorbic acidو مادة Glyoxylate كمركب اساسي يشتق منه الحامض ، و لا يوجد دليلا واضحا على الموقع المحدد لبنائه و تراكمه، ولكن لوحظ تراكم كميات قليلة من الحامض في الفجوات الخلوية لنبات الشعير الناتج من تحول حامض لـ - الاسكوربيك-L Ascorbic Acid (Davies و Asker ، 1983 ؛Wagner، 1981).اذ ان في فطر *Fomitopsispalustris*و الذي يعود الى مجموعة الفطريات البازيديةBasidiomycetes يوجد ارتباط وثيق بين استهلاك سكر الكلوكوز glucose وبناء حامض الاوكزاليك و الذي يعد كناتج عرضي في معظم المجاميع الحية حيث ان سكر الكلوكوز لا يتأكسد بشكل تام الى CO_2 في دورة الحامض الثلاثي الكاربوكسيلي(TCA) Tricarboxylic acid cycleبل يتحول الى الاوكزالاتOxalate،وان وجود ما يقارب 12 مركباً انزيمياً يعمل على ايجاد مسار ايضي جديد

مزدوج بين TCA و Glyoxylate cycles و الذي يساعد في بناء الاوكزالات ، وفي هذا المسار الايضييشترك كل من انزيم Oxaloacetase و انزيم Isocitratelyase معا ويلعبان دوراً حيوياً في تحصيل الاوكزالاتمن Oxaloacetate، عبر المسارالايضي-Acetate recycling(Munirو اخرون، 2001).يعد حامض الاوكزاليك الذي ينتج من قبل الفطر *S. sclerotiorum* عامل اساسي في تحديد امراضية الفطر على النبات اذ يدل وجود الاوكزالات وبكميات عالية على الانسجة المصابة على الدور الذي يلعبه هذا المركب في تحديد ضراوة الفطر ، كما وقد تبين ان اضافة الاوكزالات الى الانسجة النباتية بغياب الفطر بشكل مباشر يؤدي الى ظهور اعراض امراضية على النبات تشبة الاصابة بالفطر *S. sclerotiorum*(Cessnaو اخرون، 2000). كما و بين كل منRiou و جماعته،(1991)وMarciano و جماعته ،(1983)في دراستهما ان هذا الحامض يساهم في خفض الـpH للنسيج النباتي مما يؤدي الى تنشيط عدد من الانزيمات المحللة للجدار الخلوي ومنها انزيم Galacturonase ، Exo-Pectinase، Cellulose،Hemicellulaseوانزيم Protease ايضا. ومن جانب اخر فقد اضافBateman وBeer،(1965) ،ان هذا المركب يمكن ان يعمل كمركب مخلبي Chelationلايون Ca^{2+}المهم جدا في بناء الجدار الخلوي ويحد من وصوله الى الخلايا النباتية بشكل كافٍ، فضلاًعن السمية التي يمكن ان يسببها الحامض على النبات بشكل مباشر بفعل الخاصية الحامضية التي يمتلكها.

ويذهب البعض الى ان تراكمالاوكزالات يمكن أن تؤدي الى تكوين البلورات Oxalate crystals داخل النسيج مما يؤدي الى غلق الاوعية الخشبية الناقلة للماء كليا او جزئيا مما يؤدي الى الذبول و ان تراكم هذه الاملاح يمكن او يؤثر ايضا في الجهد الاوزموزي بشكل عام للنبات مما يقود الى اخلال في العمليات الفسيولوجية و الحيوية (Smith ، 2004؛ Dutton و Evans، 1996).وعلى النقيض من هذا كله يذهبReinhardt و جماعته ،(2003)،الى ان انزيم Oxalate decarboxylasesفي بعض النباتات يقوم بتكسير الاوكزالات المنتجة من قبل النباتو تحويلها الى الفورمات Formate،و ثنائي اوكسيد الكاربون CO_2،و كذلك تحليل حامض الاوكزاليك المنتج من قبل الفطر بمعزل عن الاوكسجين الى CO_2، وبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الذي يعمل كعنصر مقاومة للفطر، أي ان عامل الضراوة الذي يستخدمه الفطر لاختراق النبات يمكن ان يصبح عنصر مقاومة تستخدمه بعض الانواع النباتية و التي تمتلك صفة المقاومة المورثة. ويتأثر انتاج الفطر لحامض الاوكزاليك عند التغير في الظروف البيئية المحيطة بالفطر،فقد وجدSmith،(2004)ان تركيز حامض الاوكزليك المنتج من قبل الفطر *S.*

*minor*المتطفل على نبات الفول الصويا قد تغيرت من4.19ملغم عند درجة حرارة 25 ^{0}م الى 0.22 ملغم عند درجة 30 ^{0}ماي انخفاض معدل انتاج الفطر بارتفاع درجة الحرارة ويعود هذا الى ان القدرة الامراضية للفطر قد انخفضت بفعل الحرارة العالية والتي هي غير ملائمة لنمو الفطر الذي يفضل المستويات المنخفضة من الحرارة و الذي ادى الى خفض انتاج الحامض.اماMicales،(1995)،فقد لاحظ عند دراستهعدد من المغذيات الملحية و العوامل البيئية على انتاج الحامض من قبل الفطر *Postia placenta* المسبب لمرض التعفن البني على النباتات الخشبيةwoody plants ان انتاج الحامض ينخفض عند تغير قيمة الاس الهيدروجيني في الوسط باتجاه الحامضية وكما هو موضح في الجدول في ادناه :

Initial pH	Oxalic acid (mM)[b]
3.0	0.04 a
3.5	0.03 a
4.0	0.09 a
4.5	0.13 a
5.0	1.30 b
5.5	3.02 c

اذ

يمكن ملاحظة ان كمية الحامض قد كانت عند اقل معدل لها عند 3.0 pH فيما وصلت الى اعلى معدل لها عند 5.5 وهو الوسط الملائم لنمو معظم الفطريات بشكل طبيعي ويمكن ايضا ان نلاحظ التغير الملحوظ في تركيز الحامض عند 5.0 - 5.5 .

و فيالسياق نفسه فقد اشار Dickman وRollins ،(2001)الى ارتفاع الرقم الهيدروجيني للوسط باتجاه القاعدي يؤدي الى تحفيز الفطر على انتاج حامض الاوكزاليك بكميات اكبر وهذا بدوره يؤدي الى عودة الرقم الهيدروجيني الى الحامضية من جديد بشكل يتناسب مع حاجة الفطر الفسيولوجية و الانزيمية .و بينBolton و جماعته،(2006)،ان الفطر*S. sclerotiorum* ينتج كميات كبيرة من حامض الاوكزاليك على الاوساط القاعدية لخفض الرقم الهيدروجيني للوسط الى الحامضي الذي يعدملائماً لعمل انزيم Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) الذي يكون عمله مرافق لبناء الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* . اما تاثير ايونات المغذية فقد بينMicales،(1995)،ضمن الدراسةنفسهاان التراكيز العالية من ايوني الكالسيوم و الفسفور قد ادت الى خفض انتاج الحامض عند التراكيزالتي تتراوح ما بين 5000- 10.000 ملغم/لتر فيحين لم تسجل التراكيز الاقل من

1000 ملغم/لتراي تأثير يذكر على انتاج الحامض .ويعتقد ان للهورمونات النباتية دوراً في التقليل من نمو الفطر على العائل وهذا قد يؤثر كميا في انتاج حامض الاوكزاليك بشكل عام من قبل الفطر.

الفصل الثالث

المواد وطرائق العملMethods&Materials

3– 1. الأجهزة والمواد المستعملة:

الجدول (1): الاجهزة المستعملة :

ت	الجهاز	العلامة التجارية
1	حاضنة Incubator	KoreaS.-Lab Tech
2	مقياس الرقم الهيدروجيني pH Meter	England -Gallenkamp
3	ميزان حساس Analytical Balance	Germany -Sartorius
4	مجهرضوئي Light Microscope	Germany -Humascope
5	مؤصدة Autoclave	U.S.A. -Allamerican
6	غرفة تعقيم Laminar flow	KoreaS. -Lab Tech
7	تقطير الماء Distiller water	KoreaS.–Lab Tech
8	حجرةتلقيح Hood	China-Tianjin Taisite
9	جهازالبلمرةالحراري PCR Thermal Cycler	Cleaver CS – USA
10	جهاز الطرد المركزي Centerfuge	Hitech
11	جهاز رج الانابيب Vortex	Thermolyne– USA
12	جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis	Cleaver CS – USA
13	محرك مغناطيسي Magnatic stirrer	China-Tianjin Taisite
14	انابيب ابندروف Ependroff Tube	-
15	انابيب PCRTube	-
16	سحاحة زجاجية Burette	-

الجدول (2) المواد الكيميائية

ت	المادة	العلامةالتجارية
1	هيدروكسيد الصوديومNaoH	BDH- England
2	ميثانول CH_3OH	BDH- England
3	كلوريد الصوديوم NaCl	BDH- England
4	ايثانول C_2H_5OH	BDH- England
5	حامض الهيدروكلوريكHCl	BDH- England
6	كبريتات البوتاسيوم K_2SO_4	BDH- England
7	كبريتات الامونيوم NH_3SO_4	BDH- England
8	حامض الجبرليكGA_3	BDH- England
9	برمنغنات البوتاسيوم $KMnO_4$	BDH- England
10	وسط أكاردكستروز البطاطا PDA	HIMEDIA- India
11	أكار- أكار Agar-Agar	HIMEDIA- India
12	هايبوكلورات الصوديوم NaOCl	تجاري
13	حامض السلساليك SA	BDH- England
14	صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide	Promega - USA
15	محلول (TBE) bufferTrise– EDTA	Promega - USA
16	عدة استخلاص DNA Extarction kit	Promega - USA
17	عدة خليط تفاعل بلمرة Master Mix	Bioneer
18	محلول Ladder DNA (100 bp)	Bioneer
19	محلول تحميل DNA Loading Dye	Promega - USA
20	هلام الاكاروز Agarose Gel	Promega - USA
21	انزيم اللايتيكيز Lyticase	US- Biological
22	محلول Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid	BDH- England
23	محلول ايزوبروبانول Isopropanol	Scharlau- Spain
24	صبغة اللاكتوفينول Lactophenol	تحضير مختبري
25	كلورامفينكول Chloramphenicol كمضاد حيوي واسع الطيف ضد البكتريا .	

26	كلوتريمازولClotrimazole مضاد حيوي ضد التلوث الطارئ الذي حدث بفعل الفطر *Trichotheciumrosum*

3–2- الأوساط الزرعية المستعملة:

3-2-1 وسط أكاردكستروز البطاطاPotato Dextrose Agar (PDA)

حضر بإذابة **39** غم من مسحوق الوسط الجاهز في كمية كافية من الماء المقطر و يكمل الحجم الى 1 لتر وحسب تعليمات الشركةالمصنعة**(HIMEDIA)**. استعمل هذا الوسط لتنمية الأنواع الفطرية جميعاً, وكذلك في فحص حساسية الفطر ***S.sclerotirum*** تجاه العوامل البيئية و الكيميائية المستخدمة ضد الفطر.

3-2-2- وسط حبوب القمح :

حضر هذا الوسط باضافة بوضع 20 غم من حبوب القمح مع كمية كافية من الماء المقطر وعقمت بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121ºم و ضغط 15 جوو لمـــدة 20 دقيقة، واضيف اليه المضاد الحيوي وحسب طريقة محمد، (2001). ويستخدم هذا الوسط لانتاج الاجسام الحجرية للفطر قيد الدراسة.

3-2-3- وسط سكروز البطاطا السائل : Potato Sucrose Broth

حضر الوسط السائل **Potato sucrose broth(PSB)** (200 غم بطاطا ، 20 غم سكروز ، 1 لتر ماء) . و وزعت في دوارق سعة 250 مل عقمت بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121ºم و ضغط 15 جوو لمـــدة 20 دقيقة ثم تركت لتأخذ درجة حرارة المختبر . ويستخدم هذا الوسط لاختبار قدرة الفطر على انتاج حامض الاوكزاليك (**steven** ، 1981).

3-2-4- وسط المانيتول اكار : MannitolAgar

حضر هذا الوسط باذابة كل من 10 غم من Mannitol ، 0.5 غم K_2HPO_4 ، 0.2 غم$MgSO_4 .7H_2O$ ، 0.1 غمNaCl ، 3.0 غم $CaCO_3$ ، 15 غم Agar في كمية كافية من الماء المقطر ويكمل الحجم الى 1 لتر.خلطتالمكونات في دورق زجاجيو عقمت بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121ºم و ضغط 15 جوو لمـــدة 20 دقيقة و استخدم هذا الوسط لتنمية الفطر *S.sclerotirum* وقياس الاختلاف بالنمو عن الاوساط الاخرى.

3-2-5- وسط الاكار المغذي Nutrient agar(NA)

حضر بإذابة **(39)** غم من مسحوق الوسط الجاهز المحتويات وحسب تعليمات الشركة المصنعة**(HIMEDIA)**في كمية كافية من الماء المقطر و ثم اكمل الحجم الى 1 لتر. عقم بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121ºم و ضغط 15 جوو لمـــدة 20 دقيقة.اذاستعمل هذا الوسط لتنمية الفطر ***S.sclerotiorum*** و فحص حساسيته تجاه الاختلاف في الاوساط الغذائية.

3-2-6- وسط الزابك اكارCzapeksDox Agar

حضر هذا الوسط بحسب طريقة**Tuite**(1969)،وذلك باذابة 20 غم من الاكار- اكار في **500**مل من الماء المقطر في دورق زجاجي ، واذيبت باقي مكونات الوسط و التي تشمل 30 غم سكروز و 2 غم $NaNO_3$ و 1 غم K_2HPO_4 و 0.5 غم $MgSO_4$ و 0.5 غم **KCl** و 0.01 غم $FeSO_4$في 400 مل من الماء المقطر في دورق زجاجي اخر و مزجت محتويات الدورقين معا واكمل الحجم الى 1 لتر ثم وزع الوسط على دوارق زجاجية سعة 250 مل وعقمت بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121ºم و ضغط 15 جوو لمـــدة 20 دقيقة واضيف ثم صب الوسط في اطباق بتري لغرض الاستعمال.

حضرت الاوساط السائلةلغرض قياس كمية حامض الاوكزاليك المنتج باستعمال الطريقة نفسها و التراكيز التي ذكرت مع مراعاة عدم اضافة مادة الاكار لكي لا تتصلب ، اما وسط الدكستروز المغذي فتم تحضيره من خلال اذابة 20 غم من الدكستروز في 1 لتر من الماء المقطر و تم تعقيمه كما في اعلاه.

3- 2-7. الصبغات والمحاليل المستعملة:

1- صبغة اللاكتوفينول أزرق المثيلين :

حضرت وفقا الى Ellis(1994) من المواد التالية:

المثيلين الأزرق 0.05 غم، بلورات الفينول 20 غم ، كليسيرول 40 مل ، حامض اللاكتيك20 مل و ماء مقطر .واستخدمت لتصبيغ الفطريات وتثبيتها لغرض الفحص ألمجهري .

2 – محلول هيدروكسيد الصوديومNaOH Solution

تم تحضيره من إذابة 8 غم من هيدروكسيد الصوديوم في 100 مل ماء مقطر , واستخدم لمعايرة الأس الهيدروجيني في الوسط ألزرعي.

3- محلول حامض الهيدروكلوريك 10 عياري:

حضر هذا المحلول حسب التعليمات الخاصة بالشركة المصنعة واستخدم لغرض لتعديل الاس الهيدروجيني للاوساطالزرعية المستخدمة في الدراسة.

4- محلول برمنغنات البوتاسيوم 0.02 عياري:

حضر باذابة 0.316غم من مسحوق برمنغنات البوتاسيوم في كمية كافية من الماء المقطر ثم اضيف الى 100 مل من الماء المقطر واستخدم هذا المحلول في تقدير كمية حامض الاوكزاليك المنتج من قبل الفطر.

3-3-المواد و المحاليل المستعملة في تقنية PCR:

1- محلولBufferTrise– EDTA(TBE)

استخدم المحلول المجهز من شركة **promega** الاميركية. حفظ المحلول بدرجة 25°م لحين الاستعمال.

2- محلول **Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid(EDTA)(0.5 M)**

استخدمت مادة **EDTA** المجهزة من قبل شركة **BDH- England** و حضر المحلول باذابة 9.3 غم من **EDTA** في 40 مل من الماء المقطر و اكمل الحجم الى 50 مل وضبط الرقم الهيدرروجيني الى 8 ثم عقم وحفظ بدرجة حرارة 4°م.

3- خليط تفاعل البلمرة **Master Mix**

استخدمت العدة المجهزة من شركة **Bioneer**و التي تضمنت المكونات التالية

- انزيم البلمرة **Top DNA polymerase**
- **DeoxyNucleotides Triphosphate**والتي تتضمن 250 ميكرومولاً لكل من **(dTTP, dCTP, dGTP, dATP)**.
- 10 ملي مول من **Trise – Hcl (9.0pH)**
- 30 ملي مول من **KCl**
- 1.5 ملي مول من $MGCl_2$
- **Stabilizer and Tracking Dye**

4- محاليل استخلاص الحامض النووي الرايبوزي **DNAExtarction kit**

استخدمت عدة استخلاص مجهزة من شركة**Promega**والتي تضمنت ما يأتي

- **DNA Rehydration Solution**
- **Protein Precipitation Solution**
- **Cell Lysis Solution**

- **Nucleic Lysis Solution**
- **RNAS Solution**
- انزيم**lyticase**

استخدم الانزيم المجهز من قبل شركة **US- Biological** لغرض تكسير الجدار الخلوي لخلايا الفطر.

- ايزوبروبانول **Isopropanol**
- ايثانول % 70

3-4-المواد و المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي Electrophoresis

- محلول **Trise-Borate EDTA Buffer (TBE)** استخدم المحلول المجهز من شركة **Promega**.
- محلول صبغة برميدالاثيديوم (0.5 %) **Ethidium Bromide**
- محلول التحميل **DNA Loading Buffer**
- محلول **Ladder DNA(100 bp)** المجهز من شركة **Bioneer**
- هلام الاكاروز **Agarose Gel Prepration**

3-5-البادئ الخاص الذي استخدم في عملية التضخيم للكشف عن نوع السلالة للفطر *S.sclerotiorum*

استخدم البادئ المبين في الجدول (3) في تحديد التسلسل الخاص للقطعة الجينية (**ERICEntrobacterial Repetitive Intergenic**) وفقا **Safaie** و جماعته (2012) والذي جهز من قبل شركة **Alpha DNA**

الجدول (3) : البادئ المستخدم في الدراسة

Primer	Nucleotide sequence	Length (BP)	Anneling Temp.	Size of product
ERIC Primer	F-5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3'	22	45 C	270-4300 Kb
	R-5'-ATGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	22	45 C	

3-6- عزل الفطر وتنقيته:

تم عزل وتنقية الفطر *S. sclerotirum* من نباتات الباذنجان المصابة بالفطر من مناطق مختلفة، شملت البيوت البلاستيكية في كلية الزراعة في ابي غريب ببغداد ،و كذلك من البيوت البلاستيكية التابعة لقضاء المسيب في بابل في كانون الثانيمن عام 2012، و بعد عزلها و تشخيصها وفقاً لما اورده Kohn (1979) و Tariq و اخرون (1985) و Saharan و Metha (2008). وجد انها تعود الى نفس النوع، تم اكثار الفطر على وسط الحنطة كما جاء في محمد، (2011) لغرض انتاج الاجسام الحجرية و الاحتفاظ بها لحين اجراء التجارب. و قبل زراعة الاجسام الحجرية ، يتم غسلها بالماء العادي، و من ثم تعقيمها سطحياً بغمرها لمدة ثلاث دقائق بمحلول الكلوراكس التجاري 0.06% ، ومن ثم غسلها عدة مرات بالماء المقطر المعقم ، و تجفف على اوراق ترشيح معقمة.

3-7- تشخيص سلالة الفطر جزيئيا باستعمالتقانةالـPCR:-

اولا- استخلاص الحامض النووي DNA و تنقيته

اذ اتبعت طريقة (**Munoz– Cadavid** و اخرون ،2010) بعد التعديل عليها و استخدام انزيم **Lyticase** لتكسير الجدار الخلوي للفطر. و كما يلي:

1- تنمية الفطر ***S.sclerotiorum*** على وسط **PDA** ولمدة خمسة ايام وبدرجة حرارة18°م ±2 ، ثم نقل قرص بقطر 10 ملم من مستعمرة الفطر الى انبوب ابندروف حاوي على 293 مايكروليتر من **EDTA** ثم سحق بواسطة عيدان خشبية.

2- اضيف7.5 مايكروليتر من 20ملغم/ مل انزيم **Lyticase** مع التحريك بلطف لغرض المزج

3- حضنت العينات بدرجة 37°لمدة 30 -60 دقيقة لكي يقوم الانزيم بتحطيم الجدار الخلوي ، ثم بردت بدرجة حرارة الغرفة.

4- نبذت مركزيا بسرعة 14000 دورة /دقيقة لمدة دقيقتين و ازيل الرائق.

5- اضيف 300 مايكروليتر من محلول التحلل **Nuclei Lysis Solution**الى كل انبوبة ابندروف الحاوية على الراسب و حركت بلطف لغرض المزج.

6- اضيف 100 مايكروليتر من محلول ترسيب البروتينات **protein precipitatio solution**، و مزجت الانابيب جيداً بواسطة المازج الكهربائي **vortex mix** لمدة 30 ثانية.

7- تركت العينات على الثلج لمدة خمس دقائق ، بعدها نبذت مركزياً بسرعة 14000 د/دقيقة لمدة ثلاث دقائق.

8- نقل الرائق الحاوي على **DNA** المستخلص بواسطة ماصة دقيقة الى انابيب ابندروف نظيفة ومعقمة حاوية على 300 مايكروليتر من الايزوبوبانول.

9- قلبت الانابيب عدة مرات بلطف لحينظهور **DNA**بشكل يشبه الخيط. ثم نبذت مركزيا بسرعة 14000 د/دقيقة لمدة دقيقتين. ثم ازيل الرائق وقلبت الانابيب على ورق نشاف معقمة. اضيف 300 مايكروليتر من % 70 ايثانول وقلبت عدة مرات لغسل **DNA** المترسب.

10- نبذت مركزياً بسرعة بسرعة 14000 د/دقيقة لمدة دقيقتين ثم ازيل الايثانول برفق.

11- قلبت الانابيب على ورق نشاف معقمة لمدة 10-15 دقيقة لغرض تجفيف الراسب.

12- اضيف50 مايكروليتر من محلول**solutionDNA Rehydration**.

13- اضيف1.5 مايكروليتر من **RNase Solution**لنتقية **DNA**. ثم مزجت الانابيب لمدة ثانيتين بواسطة المازج الكهربائي ، ثم نبذت مركزيا لمدة 5 ثوان لجمع السائل المتبقي على جدران الانبوبة و حضنت بدرجة حرارة 37˚ م لمدة 15 دقيقة.

14- حضنت الانابيب بدرجة 65˚م و لمدة 60 دقيقة لعمل **Rehydrate DNA** .

ثانيا ـ الكشف عن الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA)

استخدمت تقنية الترحيل الكهربائي **Electrophoresis**باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1 % للكشف عن الحامض النووي منقوص الاوكسجين و استعملت المحاليل:

Agarose, TBE buffer, Ethedium bromide, DNA Marker, Bromophenolblue.وتم الكشف عن الـ **DNA**بحسب الطريقة التي ذكرت من قبل **Sambrook** واخرون(**1989**) و**Al-azawy**،(**2011**)والتي تتضمن ثلاث مراحل:

A- تحضير هلام الاكاروز **Prepration of Agarose Gel**

- وضع 100 مل من دارئ **TBE** في بيكر
- اضيف غرام واحد من الاكاروز الى الدارئ.
- وضع الدارئ على الـ **Microwave** الى حد الغليان و ذوبان جميع المكونات.
- رفع الهلام من التسخين و ترك ليبرد حتى 50-60˚م

B- تحضير قالب هلام الاكاروز

- وضع المشط في احدى نهايتي قالب الهلام

- صب الاكاروز بعد سد نهايتي القالب بشريط لاصق لمنع تسرب الاكاروز و من ثم ترك ليبرد بدرجة حرارة المختبر
- وضع القالب في تجويف جهاز الترحيل الكهربائي بعد رفع المشط من قالب الهلام بعناية ومن ثم ملء تجويف بمحلول دارئ **TBE buffer** .

C- تحميل الـ **DNA** على قالب هلام الاكاروز

- اضيف 9 مايكرو ليتر من الحامض النووي منقوص الاوكسجين الى 3 مايكروليتر من صبغة **Loading Dye DNA** وثم وضع المزيج في حفر الهلام.
- شغل جهاز الترحيل الكهربائي بفرق جهد 70 فولت وبتيار 100 ملي امبير و ترك سريان الصبغة الى الجانب الاخر من قالب هلام الاكاروز.
- بعد اكتمال الترحيل وضع هلام الاكاروز على وحدة الاشعة فوق البنفسجية **UV** وفحصت حزم **DNA** المتداخلة مع الصبغة حيث ظهرت بشكل حزم برتقالية اللون.

ثالثاً ـ طريقة عمل تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

استخدمت تقنية **PCR**لتضخيم المنطقة المعروفة باسم **EntrobacterialRepetitive Intergenic**باستخدام البادئ المذكور انفا في الجدول (3). اذ اجريت طريقة العمل بحجم ***µl***20 و كما موضح في الجدول (4)

الجدول (4):مواد تفاعل البلمرة المتسلسل

المواد	الحجم(مايكروليتر)
Master Mix	5
Primer Forward	2.5
Primer Reverse	2.5
DNA	5
Nuclease- Free Water	اكمل الحجم الى 20
Total	20

بعد اكتمال الاضافات جميعها طردت العينات مركزيا بواسطة جهاز الطرد المركزي الخاص بانابيب **PCR**ونقلت الى جهاز البلمرة الحراري **PCR Thermal Cycler**وضبط الجهاز على البرنامج التالي في الجدول(5) :

الجدول (5) : برناج جهاز البلمرة الحراري

ت	خطوات	الحرارة (م)	الزمن	عدد الدورات
1	**Initial Denaturation**	˚95	**2min**	1
2	**Denaturation**	˚ 94	**1min**	35
3	**Annealing**	˚72	1.5 **min**	
4	**Elongation**	˚72	**2 min**	
5	**Final Extention**	˚ 72	**8min**	1

رابعاً - الترحيل الكهربائي للناتج :

استخدمت الطريقة السابقةنفسها للكشف عن ناتج عملية التضخيم ولكن استخدم هلام الاكاروز بتركيز 1.5 % و ليس 1 %. مع استخدم محلول **Ladder DNA(100 bp)**لغرض المقارنة.

3-8- تأثير بعض العوامل البيئية والكيميائية في نمو الفطر وانتاج الاجسام الحجرية :

3-8-1- درجة الحرارة:-

بعد تصلب الوسط**PDA**، تم نقل قرص بقطر **5** ملم بوساطة ثاقب الفلين **Cork borer** إلى وسط الطبق من مزرعة الفطر***S. Sclerotiorum***النامي على وسط **PDA** و بعمر **5** أيام بعدها حضنت الأطباق جميعها بدرجات الحرارة10 ، 15 ، 20 ، 25 و 30˚م,وبمعدل اربع مكررات لكل مستوبو لمدة 12 يوما . و تم قياس قطر المستعمرة النامية (معدل قطرين متعامدين)، و سجلت النتائج ، وحسب معدل النموكذلك حساب عدد و حجم الاجسام الحجرية النامية على الوسط.

3-8-2-الـpH:-

استعملت مستوياتعدة من **pH**3.5 ، 4.5 ، 5.5، 6.5، 7.5 ، 9و 10.5 من خلال إضافة بضع قطرات من القاعدة **NaOH** بتركيز **10N** , أو بضع قطرات من **HCl** بتركيز **10N** إلى وسط **PDA** بعد إن برد إلى 40°م وفي ظروف معقمة و تم قياسها باستخدام جهاز قياس الرقم الهيدروجيني **pH Meter** و بمعدل اربع مكررات لكل مستوى(**Agnihotr** و **Rai**، 1971). و بعد تصلب الوسط، تم نقل قرص بقطر **5** ملم بوساطة ثاقب الفلين **Cork borer** إلى وسط الطبق من مزرعة الفطرالنامي على وسط **PDA** و بعمر **5** أيام , بعدها حضنت الأطباق جميعها لمدة 12 يوماًوبدرجة حرارة 18°م ± 2. و تم قياس قطر المستعمرة النامية و سجلت النتائج ، وحسب معدل النمو القطري(معدل قطرين متعامدين)، وكذلك حساب عدد و حجم الاجسام الحجرية النامية على الوسط تحت تأثير الظروفنفسها اعلاه

3-8-3-نوع الوسط الغذائي :-

اعتمدت عدة انواع من الاوساط الغذائية لدراسة تأثير الوسط الغذائي في نمو الفطر ***S. sclerotiorum***و هي وسط الزابك اكار **CzapeksDox Agar** ،وسط المانيتول اكار **AgarMannitol**، وسط اكار دكستروز البطاطا **Potato Dextrose Agar**و وسط الاكار المغذي (**Nutrient agar (NA**و التي حضرت كما في الفقرة (3–2)وصبت الاوساط في اطباق بتري وبواقع اربع مكررات لكل وسط وبعد تصلب الوسط تم نقل قرص بقطر **5** ملم بواسطة الثاقب الفلينيCorkborer إلى وسط الطبق من مزرعة الفطر***S.sclerotiorum***النامي على وسط **PDA** و بعمر **5** أيام , بعدها حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة 18±**2**°م و لمدة 12 يوم(**Ragab** و اخرون ، 1997) .و تم قياس قطر المستعمرة النامية(معدل قطرين متعامدين)، و سجلت النتائج بحساب قطر المستعمرة النامية وحساب الاجسام الحجرية لكل وسط ومراحل تكونها .

3-8-4-نوع وتركيزالعناصر المغذية:-

استعملت خمسة مستويات من التراكيز الملحية 10، 10^2 ،10^3 ، 10^4، 10^5ملغم/لترلعدد من الاملاح المغذية للنبات$CaCo_3$ ، $(NH_4)_2SO_4$وK_2SO_4وبواقع اربع مكررات لكل مستوى وذلك بإذابة 100 غم من مسحوق الملح في كمية كافية من الماء المقطر و من ثم اكمل الحجم الى 1 لتر، ومن ثم عمل عدد من التخفيفات لحين الوصول الى التراكيز المطلوبة ومن ثم اضافتها الى الوسطمع مراعاة معايرة الاس الهيدروجيني للوسط الذي يتغير بفعل وجود الاملاح القاعدية والحامضية (**Hassan** و **Shahzad**، 2004) ومن ثم تم تعقيمها

بجهاز المؤصدة عند درجة حرارة 121ºم و ضغط 1.5 جوو لمدة 20 دقيقة و بعد تصلب الوسط، تم نقل قرص بقطر **5** ملم بوساطة ثاقب الفلين **Cork borer** إلى وسط الطبق من مزرعة الفطر ***S. sclerotiorum*** النامي على وسط **PDA** و بعمر **5** أيام , بعدها حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة 18±**2**°م و لمدة 12 يوماً . و تم قياس قطر المستعمرة النامية و سجلت النتائج ، وحسب معدل النمو القطري(معدل قطرين متعامدين)، وكذلك حساب عدد و حجم الاجسام الحجرية النامية على الوسط تحت تأثير الظروفنفسها اعلاه.

3-8-5-نوع وتركيز منظمات النمو النباتية:-

1- **حامض الجبرليكGA_3**

استعملت خمسة مستويات من المركب حامض الجبرليك**GA_3**:50، 100 ،150 ، 200,250**ppm**، اذتمت الاضافةبنفس التراكيز المستخدمة على النبات وبواقع اربع مكررات لكل مستوى وذلك باذابة0.5 غم من المركبفي كمية كافية من **NaOH**المركز لغرض الاذابة ومن ثم اكمال الحجم الى 1 لتر باستخدام الماء المقطر ومن ثم عمل عدد من التخفيفات لحين الوصول الى التراكيز المطلوبة و تم التعقيم باستخدام **Millipore filter 0.22** ، ويتم اضافتها الى الوسطبواقع100 مايكروليتربعد تصلب الوسطوحسب طريقة**Al-Masri** و جماعته**(2002)** و تم نقل قرص بقطر **5** ملم بوساطة ثاقب الفلين **Corkborer** إلى وسط الطبق من مزرعة الفطر ***S.sclerotiorum*** النامي على وسط **PDA** و بعمر **5** أيام , بعدها حضنت الأطباق بدرجة حرارة 18±**2**°م ولمدة 12 يوم . و تم قياس قطر المستعمرة النامية(معدل قطرين متعامدين)، و سجلت النتائج ، وحسب معدل النمو القطري وكذلك حساب عدد و حجم الاجسام الحجرية النامية على الوسط .

2- حامض السلساليكSA

استعملت خمسة مستويات من المركب حامض السلساليك**SA** :50، 100 ،150 ، 200و250ملغم / لتر والذي حضر باذابة 0.25 غم من المركبفي كمية كافية من **NaOH**المركز (2 عياري) لغرض الاذابة ومن ثم اكمال الحجم الى 1 لتر باستخدام الماء المقطرللحصول على تركيز250 ملغم /لتر،ومن ثم عمل عدد من التخفيفات لحين الوصول الى التراكيز المطلوبة و تم التعقيم باستخدام **Millipore filter 0.22** ، وتم اضافتها الى الوسطبواقع 100 مايكروليترمن المحلول ،بعد تصلب الوسطو بواقع اربع مكررات لكل مستوى وذلكحسب طريقة**Al-Masri** و جماعته**(2002)**، ثم نقل قرص بقطر **5** ملم بوساطة ثاقب الفلين **Cork borer** إلى وسط الطبق من مزرعة الفطر ***S.sclerotiorum*** النامي على وسط **PDA** و بعمر **5** أيام , بعدها حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة 18±**2**°م ولمدة 12 يوم .

و تم قياس قطر المستعمرة النامية (معدل قطرين متعامدين)، و سجلت النتائج ، وحسب معدل النمو القطري وكذلك حساب عدد و حجم الاجسام الحجرية النامية على الوسط .

3-9-تقدير كميةحامض الاوكزاليك المنتج من قبل الفطر:-

حضر الوسط بطاطا دكستروز السائل **Potato Dextrose Broth (PDB)** حسب طريقة **steven** (1981) بدون اضافة الاكار، اضيف اليه المضاد الحيوي الكلورمفينيكول (**Chloramphenicol**) بمعدل 250 ملغم/ لتر. عقم بدرجة حرارة 121ºم و تحت ضغط 15 جو لمدة 20 دقيقة ، ثم صب الوسط في دوارق سعة كل منها 250 مل بواقع 100 مل / دورق ، و بواقع خمس مكرراتلكل معاملة، لقح كل وسط زرعي في كل دورق بخمسة اقراص بقطر 1 سم ، ومن مستعمرة بعمر 5 ايام، و لغرض تنفيذ التجارب الخاصة بتأثير الظروف البيئية و الكيميائية بكمية حامض الاوكزاليك ملغم/ لتر المنتج و كما يلي :

اولاً:-

1- لدراسة تأثير درجات الحرارة، حضنت الدوارق الحاوية على الوسط السائل الملقح بفطر ***S.sclerotiorum*** لمدة 12 يوم بدرجات حرارة 20، 25، 30، 35ºم .
2- لدراسة تأثير الرقم الهيدروجيني،تماضافة بضع قطرات من القاعدة **NaOH** بتركيز **10**عياري او بضع قطرات من **HCl** بتركيز **10**عياري الى الوسط الزرعي مع مراعاة تعقيم المحاليل باستعمال المؤصدة للحصول على مستويات من الـ **pH3.5**، **5.5** ، **7.5**و **9.5** وتحت ظروف معقمة وباستعمال **pH meter**(**Agnihotr**و **Rai** ، **1971**)، تم التلقيح كما في اعلاه ،وحضنت لمدة **12** يوما بدرجة حرارة **°2±18**م.
3- لدراسة تاثير نوع الوسط المغذي : حضرت الاوساط السائلة كما في الفقرة 3-2 بدون اضافة الاكار ، مع مراعاة تعقيم الاوساط واجراء التلقيح كما في اعلاه وحضنت لمدة **12** يوما بدرجة حرارة **°2±18**م.
4- لدراسة تأثير الاملاح المغذية : استعملت كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ ، و كاربونات الكالسيوم CaC_{O3} وكبريتات البوتاسيوم K_2SO_4 ، كل على حدة وبالتراكيز **0**، 10^3 ، 10^4 و 10^5 ملغم/لتر . وتم تحضير المحلول الاساس **Stock solution** 10^5 جزء بالمليون وذلك بإذابة وزن **100**غم من الملح الجاف في كمية كافية من الماء المقطر واكمل الحجم الى 1 لتر بالماء المقطر ، وعملت منه بقية التراكيز، مع مراعاة تعديل **pH** الوسط (**Hassan** و **Shahzad**، **2004**) و

تعقيم المحاليل باستعمال المؤصدة.تم التلقيح كما في اعلاه ،وحضنت لمدة **12** يوما بدرجة حرارة **°2±18**م.

5- لدراسة تأثير منظمات النمو : استعمل حامض الجبرليك(**GA3**) بنفس مدى التركيز المستعمل على النباتات ، وحضر باذابة **0.5**غم من حامض الجبرلين بكمية قليلة من **NaOH** المركز ،واكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر ،للحصول على التركيز 500جزء بالمليون المحلول الاساس **Stock solution**، وعملت منه بقية التراكيز **0,200,150** و**250**جزء بالمليون .استعمل حامض السلساليك **Salicylic Acid (SA)** بنفس مدى التركيز المستعمل على النباتات ، وحضرباذابة **0.25**غم من حامض السلساليك بكمية قليلة من **NaOH** المركز ،واكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر ،للحصول على التركيز **250**جزءبالمليون المحلول الاساس **Stock solution**، وعملت منه بقية التراكيز **0،150 ، 200** و **250**ملغم/لتر . مع مراعاة تعقيم المحاليل كلها باستخدام **Millipore filter 0.22** تم التلقيحكما في اعلاه ،وحضنت لمدة **12** يوما بدرجة حرارة **°2±18**م.

ثانياً:-

رشحت الاوساط الزرعية مع التفريغ للتخلص من الغزل الفطري الموجود في الوسط على ورقةالنشاف (**Smith ، 2004**).

ثالثاً :-

قدر حامض **Oxalic acid** وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل **Bateman** و **Beer** ،(**1965**) وذلك بالتسحيح مع **0.02**عياري برمنغنات البوتاسيوم حتى ظهور اللون الوردي وحسبت كمية الحامض له على أساس إن كل **1**مل**0.02**عياري من برمنغنات البوتاسيوم تعادل **1.2653** ملغم من حامض الاوكزاليك .

كمية حامض الاوكزاليكOxalic Acid= الحجم المستهلك من البرمنغنات×1.2653

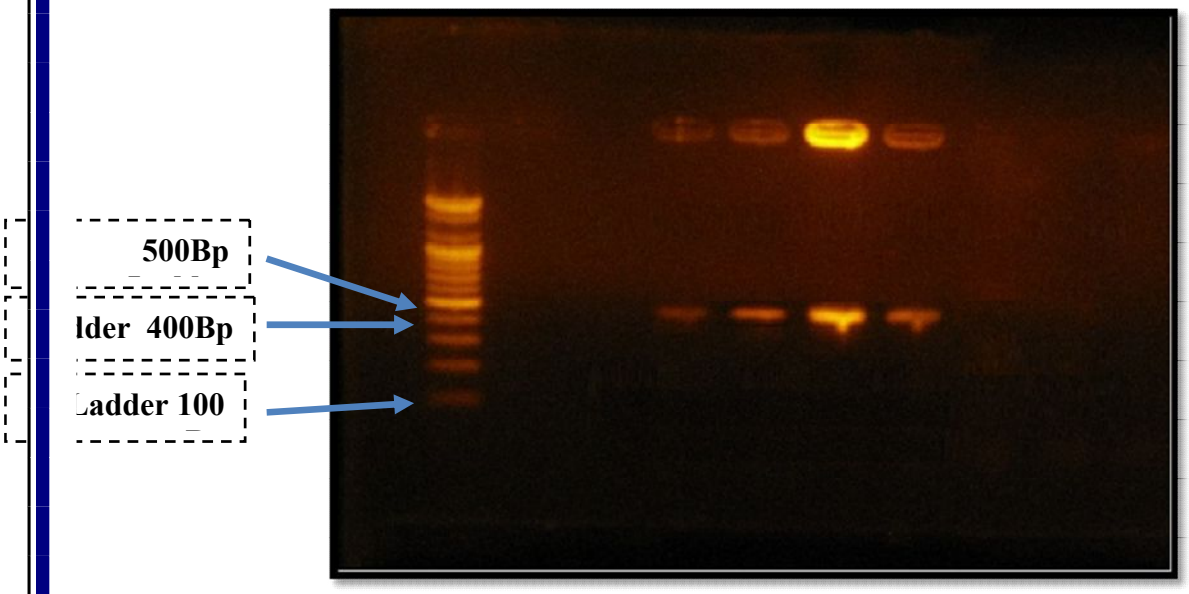
3 – 10- التحليلات الإحصائية :

استخدمت تجارب عاملية بالتصميم العشوائي التام Completely Randomized Design (CRD) وبواقعاربع مكررات ، و حللت النتائجباستخدم اختبار أقل فرق معنوي L.S.D و على مستوى احتمالية 0.05 (الإمام ، 2007).

الفصل الرابع : النتائج Result The

4-1-تشخيص سلالة الفطر جزيئيا باستعمالتقانة الـ PCR :-

بعد التشخيص المظهري و التأكد من ان الفطر هو *S. sclerotiorum* ، اجري اختبار تفاعل البلمرة التسلسلي مع عزلة الفطر *S. sclerotiorum* واظهرت النتائج ان العزلة تحتوي على الجين المستهدف للسلالة المعروفة باسم (MCG) عند الموقع (475 bp) و كما موضح في الشكل (1)



الشكل (1) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لناتج التضاعف DNA لعزلة الفطر *S. sclerotiorum*

4-2- تأثير بعض العوامل البيئية والكيميائية في نموالفطروانتاج الاجسام الحجرية:

4-2-1 درجات الحرارة :

بينت النتائج في الجدول (6) ،وجود فروقات معنوية في مدة حضن الاوساط الزرعية الحاوية على الفطر *S. sclerotiorum*النامي على وسط PDA و 5.6 pH ، و سجلت مدة الحضن 5 ايام اقل معدللنمو الشعاعي للفطر و بواقع 6.0 سم،ولم يختلف معنوياً عن مدة الحضن 7في حين اختلف معنويا عن 10 ايام التي سجلت 6.3 سم . و يتضح من الجدول نفسه ،ان هناك فروقات معنوية في معدل درجات الحرارة التي حضنت فيها المستعمرات الفطرية *S. sclerotiorum* ، و سجلت درجات الحرارة 35°م اقل معدل لنمو الفطرو بواقع 0.5 سمو التي اختلفت معنوياً عن كل 30 و 25°م ، في حين لم تؤثر درجات الحرارة 10 ، 15 ، 20°مفي معدل قطر المستعمرة. و وجد ان هنالك تداخلا بين مدة الحضن (يوم) و درجات الحرارة (°م) ، و سجلت مدة الحضن 5 ايام بدرجة 35°م اقل معدل لنمو الفطربواقع 0.5 سم ولم تختلف عن مدة

الحضن 7 و 10 يوم بدرجة حرارة 35°م ، فيما سجل اعلى معدل لنمو الفطر بتغطية كامل الطبق(9سم)بدا من اليوم الخامس من الحضن وعند درجات 20،15،10°م.

الجدول (6) تأثيرمدة الحضن (يوم) و درجة الحرارة و التداخل بينهمافي معدل النمو (سم) للفطر *S. sclerotiorum*على الوسط PDAو5.6pH

درجة الحرارة ºم / مدة الحضن (يوم)	10	15	20	25	30	35	المعدل
5	9.0	9.0	9.0	7.7	0.6	0.5	6.0
7	9.0	9.0	9.0	9.0	1.2	0.5	6.2
10	9.0	9.0	9.0	9.0	1.8	0.5	6.3
المعدل	9.0	9.0	9.0	8.5	1.2	0.5	

$L.S.D_{0.05}$: مدة الحضن = 0.22 درجات الحرارة =0.32 التداخل = 0.56

اما الاجسام الحجرية Sclerotia فبدأ ظهورها مع اليوم السابع من الحضن وبمرحلة البادئات Intiation عند درجات الحرارة 10 ، 15 ، 20 ، 25 و 30 ºم وحتى اليوم العاشر من الحضانة والذي وصلت في الاجسام الحجرية الى مرحلة التطور و الزيادة في الحجم Development لتكمل نضجها في اليوم الثاني عشر وبمعدل قطر طبيعي تراوح بين1.0-0.5 سم فيما لم تظهر الاجسام الحجرية عند درجات الحرارة 35ºم وكما موضح في الجدول (7) :

الجدول (7) : تأثيرمدة الحضن (يوم) و درجة الحرارة و التداخل بينهما في انتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. Sclerotiorum*على وسط PDA و pH 5.6

درجات الحرارة (م) / مدة الحضن(يوم)	10	15	20	25	30	35
5	0	0	0	0	0	0
7	I.	I.	I.	I.	I.	0
10	D.	D.	D.	D.	D.	0
12	M.	M.	M.	M.	M.	0

I. مرحلة البادئات Intiation - D. مرحلة التطور-Developmentمرحلة النضج Maturation

2-2-4 الرقم الهيدروجيني pH:

أظهرتالنتائج في الجدول (8) ، وجود فروقات معنوية في مدة الحضن 5 ايام عن كل من 7 و10 ايام في حين لم تختلف مدة الحضن 7 و10 فيما بينهما بدرجة حرارة 18±2 وعلى الوسط PDA، ولم تسجل مستويات الـpH 3.5 ، 4.5،5.5، 6.5، 7.5، 9.0 و 10.5فروقات

معنوية باستثناء pH 5.5 الذي اختلف معنوياً عن pH 4.5 و6.5 ، ولم يسجل تداخلابين مدة الحضن ومستوى الـpH في كل مدد الحضن ومستويات الـ pH باستثناء مدة الحضن 5 ايام عند 7.5pHويمثل اقل معدل للنمو بواقع 8.5 سم.

الجدول (8):تأثيرمدة الحضن (يوم)و مستوى الـpHوالتداخل بينهمافي معدل نمو الفطر*S.sclerotiorum*(سم) على وسط الـ PDAبدرجة حرارة 18 ± 2 °م

pH / مدةالحضن(يوم)	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	9.0	10.5	المعدل
5	8.75	9.00	8.65	9.00	8.50	8.75	8.75	8.77
7	9.00	9.00	8.65	9.00	9.00	9.00	9.00	8.95
10	9.00	9.00	8.65	9.00	9.00	9.00	9.00	8.95
المعدل	8.90	9.00	8.65	9.00	8.80	8.90	8.90	

$L.S.D_{0.05}$: مدة الحضن = 0.18،مستوى pH = 0.26 ، التداخل = 0.47

اما انتاج الاجسام الحجرية، فلم تظهر اي اختلاف في مراحل انتاجها في مدة الحضن 5 ايام عند كل المستوياتوبمعدل قطر طبيعي تراوح بين 1.0-0.5 سم، وسجل اليوم السابع من الحضن ظهور بادئات الاجسام الحجرية Intiation عند المستويات 3.5 ، 4.5 ، 5.5 ، 6.5و 7.5 ، وفي اليوم العاشر من الحضن تم وصول البادئات الى مرحلة التطور Developmentعند المستويات 3.5 ، 4.5 ، 5.5 ، 6.5 وصولا الى النضج Maturation في اليوم الثاني عشر .فيما اظهرت المستويات 7.5 و 9.0 بقاء الاجسام الحجرية في مرحلة البادئات من دون ان تتطور في نموها حتى انتهاء مدة التجربة في اليوم الثاني عشر، ولم يسجل المستوى 10.5 اي ظهور للاجسام الحجرية طيلة مدة التجربة. كما في الجدول (9).

الجدول (9): تأثيرمدة الحضن (يوم) ومستوى الـpHفي انتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* النامي على وسط PDA بدرجة حرارة 18 ± 2 مº

pH / مدة الحضن(يوم)	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	9.0	10.5
5	-	-	-	-	-	-	-
7	I.	I.	I.	I.	I.	-	-
10	D.	D.	D.	D.	I.	I.	-
12	M.	M.	M.	M.	I.	I.	-

I. مرحلة البادئات Intiation - .D مرحلة التطور-Development مرحلة النضج Maturation

3-2-4- نوع الوسط الغذائي:

اظهرت النتائج في الجدول (10)، ان هناك فروقات معنوية في مدة حضن الاوساط الزرعية الحاوية على الفطر*S. sclerotiorum*لليوم العاشر فقط ، ولم تكن الاختلافات معنوية بين اليومين الخامس والسابع من الحضن ، بينما اختلفت معنويا عن اليوم العاشر ، واظهرت الاوساط الغذائية اختلافات معنوية فيما بينها واظهر الوسط PDA اعلى معدل للنمو . ويشير التداخل بين مدة الحضن ونوع الوسط الغذائي ان وسط الـ PDA تفوق معنويا عن كل الاوساط الاخرى منذ اليوم الخامس من الحضن .ولم يسجل وسط المانيتول MA نموا فطريا في اليومين الخامس والسابع من الحضن ، وفي اليوم العاشر سجل اقل معدل للنمو ولم يختلف معنويا عن كل من وسط الزابك اكارCDA ووسط الاكار المغذيNA.

الجدول (10) : تأثيرمدة الحضن (يوم) ونوع الوسط الغذائي و التداخل بينهما في معدل نمو الفطر *S. sclerotiorum*عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و pH 5.6

نوع الوسط / مدةالحضن (يوم)	PDA	CDA	MA	NA	المعدل
5	9.00	0.25	0.00	0.62	2.46
7	9.00	1.75	0.00	1.12	2.96
10	9.00	2.37	1.25	1.82	3.61
المعدل	9.00	1.40	0.40	1.18	

L.S.D . 0.05 : مدة الحضن =0.60 نوع الوسط =0.69 التداخل = 1.20

PDA: Potato Dextrose Agar : CDA Czapeks Dox Agar : NA Nutrient agar
MA : Mannitol

اما انتاج الاجسام الحجرية فقد بدأت بالظهور بشكل طبيعي وبمعدل قطر طبيعي تراوح بين 0.5-1.0 سم على الوسط PDA ، في حين نلاحظ تأخر انتاجها على الوسط الزابك اكار CDA حتى اليوم العاشر اذ ظهرت بمرحلة البادئات Intiation لتبلغ مرحلة النمو و التطور Development عند الثاني عشر باجسام حجرية صغيرة بلغ معدل قطرها 1 ملم واقل ، في حين لم يظهر الفطر اي قدرة على انتاج الاجسام الحجرية على بقية الاوساط. كما في الجدول(11).

الجدول (11) : تأثير نوع الوسط المغذيو مدة الحضن (يوم) و التداخل بينهمافي انتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* النامي بدرجة حرارة 18 ± 2 °مو 5.6 pH

نوع الوسط / مدة الحضن(يوم)	PDA	CDA	MA	NA
5	-	-	-	-
7	I.	-	-	-
10	D.	I.	-	-
12	M.	D.(s)	-	-

I. مرحلة البادئات Intiation - D. مرحلة التطور-Development مرحلة النضج Maturation

D.(s)مرحلة التطور باجسام حجرية صغيرة بقطر ≤ 1ملم

Potato Dextrose AgarNutrient agar : NA Czapeks Dox Agar : CDA:PDA

4-2-4- $(NH_4)_2SO_4$:

اظهرت النتائج في الجدول (12) ،وجود فروقات معنوية في مدة الحضن ، وسجل اليوم العاشر اعلى معدل لنمو الفطر *S. sclerotiorum* 9سمواختلف معنويا عن كل من اليومين الخامس والسابع ، كما توجد فروقات بين التراكيز التي استخدمت في التجربة و سجل الفطر اعلى معدل له عند التراكيز 0 ملغم / لتر (عينة المقارنة)، 10 و10^2 ملغم / لتر ، فيما بلغ النمو اقل مستوياته عند التركيز10^5ملغم /لتربواقع 3.1 سم. كما ان هنالك تداخلا بين مدة الحضنوالتركيز ، فقد بلغ الفطر اعلى معدلات للنمو عند التركيز0، 10 و 10^2منذ اليوم الخامس من الحضن حيث غطى كامل الطبق، في حين سجل اقل مستوى له عند التركيز10^5 ملغم / لتروبمعدل1.12 سم في اليوم الخامس من الحضن.

الجدول (12):تأثيرمدة الحضن (يوم) وتركيز $(NH_4)_2SO_4$ و التداخل بينهما في معدل نمو الفطر *S. sclerotiorum*عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و 5.6 pH وعلى وسط PDA.

التركيز ملغم/لتر / مدة الحضن (يوم)	0	10	10^2	10^3	10^4	10^5	المعدل
5	9.00	9.00	9.00	4.25	3.00	1.12	5.90
7	9.00	9.00	9.00	7.00	4.60	2.50	6.85
10	9.00	9.00	9.00	8.30	6.00	5.75	7.84
المعدل	9.00	9.00	9.00	6.50	4.50	3.10	

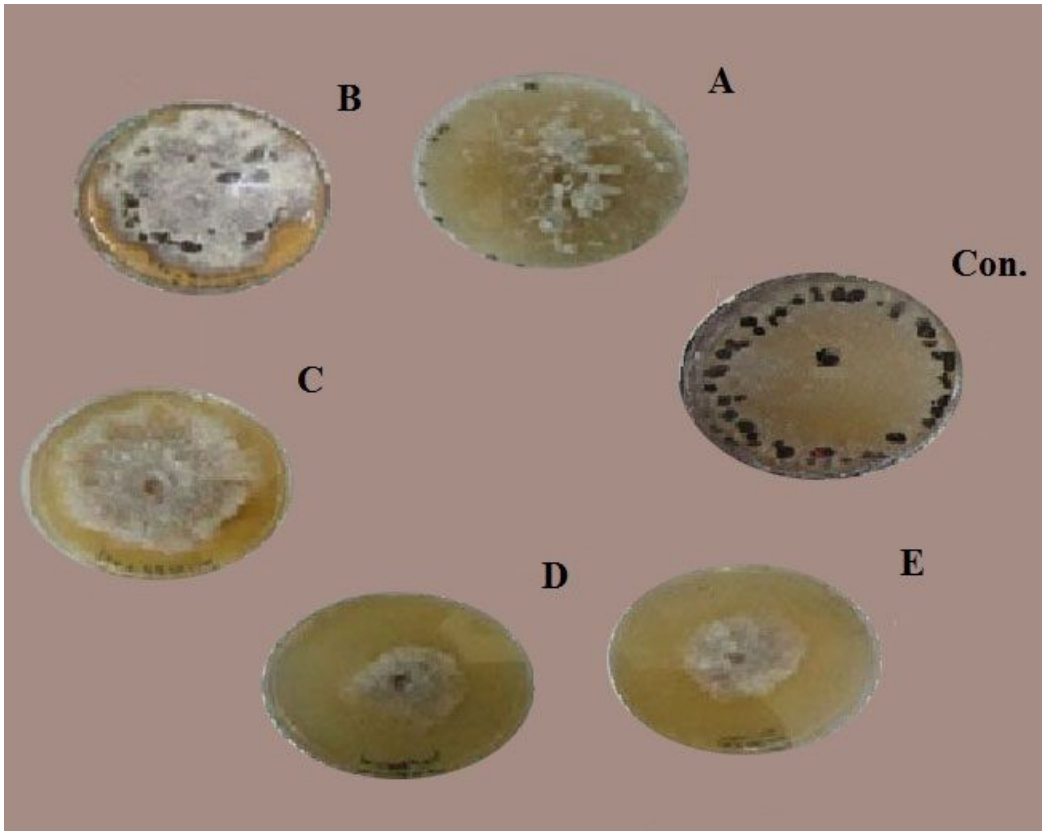
$L.S.D_{0.05}$: مدة الحضن = 0.33التركيز = 0.47 التداخل = 0.82

ويلاحظ من الجدول (13) والشكل(2)، ان انتاج الاجسام الحجرية كان طبيعياً عند التراكيز 0- 10^2 وبمعدل قطر طبيعي تراوح بين-0.51.0 سم ، في حين تأخرت بالنضج عند التركيز 10^3ملغم / لتر لتصل الى اليوم 12 وهي في مرحلة البادئات ، في حين عجز الفطر عن انتاجها عند التراكيز الاعلى حتى بعد مرور 12 يوماً من الحضن والتي تعتبر نهاية التجربة.

الجدول (13):تأثيرمدة الحضن و تركيز $(NH_4)_2SO_4$ و التداخل بينهما في انتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*على وسط PDA عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و 5.6 pH

التراكيزملغم / لتر / مدةالحضن (يوم)	0	10	10^2	10^3	10^4	10^5
5	-	-	-	-	-	-
7	I.	I.	I.	I.	-	-
10	D.	D.	D.	I.	-	-
12	M.	M.	M.	I.	-	-

I. مرحلة البادئات Intiation - D. مرحلة التطور-Development مرحلة النضج Maturation



الشكل(2):تأثيرتراكيز مختلفةمن $(NH_4)_2 SO_4$ في نمو الفطر *S. sclerotiorum* و انتاج الاجسام الحجرية على وسط PDA عند درجة حرارة 18 ± 2 °م و 5.6 pH بعد 12 يوم من الحضن

A- تركيز10 ملغم / لتر B - تركيز 10^2ملغم / لترC- تركيز10^3 ملغم / لتر

D- تركيز 10^4 ملغم / لتر E - تركيز 10^5 ملغم / لتر.Con- معاملة سيطرة

$CaCO_3$ -5-2-4:

بينت النتائج في الجدول (14)، وجود فروقات معنوية في مدة الحضن ، وسجل اليوم الخامس اقل معدل للنمو واختلف معنويا عن كل من اليومين السابع والعاشر بمعدل نمو 8.7 سم ، كما يلاحظ ان اقل معدل للنمو سجل عند التركيز 10 ملغم /لتر 8.75 سم و الذي لم يختلف معنوياً عن كل من التراكيز 0 ، 10 و 10^2ملغم/ لتر. بينما لم تسجل بقية التراكيز اختلافات فيما بينها. ولكن لوحظ حدوث تشوه واختلاف مظهري للغزل الفطري اذا يكون هش عند التراكيز العالية 10^4 و10^5 ملغم /لتر مع عدم قدرة الغزل الفطري على التجديد و النمو عند اكثاره. امالتداخل بين مدة الحضن و تركيز الـ$CaCO_3$ فان اقل معدل لنمو الفطر 8.25 سمكان عند اليوم الخامس و تحت تركيز10 ملغم / لتر واختلفت عن بقية التراكيز ، في حين وصل النمو الى اعلى معدلاته في اليوم العاشر و تحت تأثير جميع التراكيز .

الجدول (14):تأثيرمدة الحضن (يوم)و تركيز $CaCO_3$ و التداخل بينهما في معدل النمو الفطر *S. sclerotiorum*عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و 5.6pHوعلى وسط PDA

التركيز ملغم/لتر / مدةالحضن (يوم)	0	10	10^2	10^3	10^4	10^5	المعدل
5	8.60	8.25	8.75	9.00	9.00	9.00	8.70
7	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
10	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
المعدل	8.86	8.75	8.90	9.00	9.00	9.00	

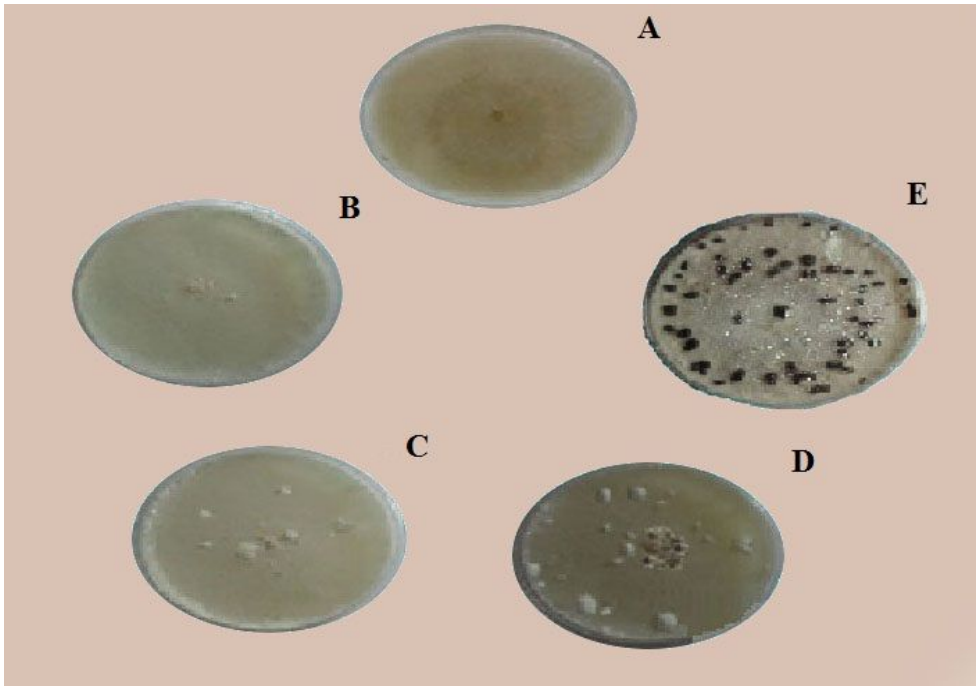
$L.S.D_{0.05}$: مدة الحضن = 0.15 التركيز = 0.21 التداخل = 0.37

و يتضح من الجدول (15) ان الاجسام الحجرية كان انتاجها طبيعيا عند التراكيز الواطئة 10،10^2 فضلا عن عينة المقارنة 0 ملغم / لتر حتى بدأ انتاجها يضعف عند التراكيز العالية تدريجيا، و توقف انتاج الاجسام الحجرية عند مرحلة التطورفي التركيز 10^3ملغم / لتر و و في مرحلة البادئات عند التركيز 10^4في اليوم 12 من الحضن الشكل (3)، فيما عجز الفطر عن انتاجها تحت تأثير 10^5ملغم / لتر(نفس الشكل3).

الجدول (15) تأثيرمدة الحضن (يوم) و تركيز $CaCO_3$في انتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*على وسط PDA عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و 5.6 pH

التركيزملغم /لتر / مدة الحضن (يوم)	0	10	10^2	10^3	10^4	10^5
5	-	-	-	-	-	-
7	I.	I.	I.	I.	-	-
10	D.	D.	D.	I.	-	-
12	M.	M.	M.	D.	I.	-

I. مرحلة البادئات Intiation - D. مرحلة التطور-Development مرحلة النضجMaturation



شكل (3):تأثيرتركيز $CaCO_3$في نمو وانتاج الاجسام الحجرية للفطر*S. sclerotiorum*على وسط PDA عند درجة حرارة 18 ± 2 ºم و pH 5.6 بعد 12 يوما من الحضن.

A- غزل فطري مشوه للفطر*S. sclerotiorum* خالي من الاجسام الحجرية عند تركيز 10^5 ملغم/ لتر B -غزل فطري عند التركيز 10^4 ملغم/ لتر

C–10^3 ملغم/ لتر غزل فطري مع بادئات الاجسام الحجرية

D- تركيز10^2 ملغم/ لترغزل فطري مع مراحل مختلفة من تخليق الاجسام الحجرية

E- تركيز 10 ملغم / لتر نمو الغزل الفطري مع اجسام حجرية طبيعية

4-2-6- K_2SO_4:

تشيرالنتائج في الجدول (16)،الى عدم وجود اختلاف معنوي في مدة الحضن5 ايام عن 7 ايام ،في حين اختلفت معنوياً عن مدة الحضن 10 ايام ، وسجل اقل معدل لنمو الفطر 7.5 سم ، ولم يكن هناك فرقاًمعنوياًبين 7 و10 يوم . ومن نفس الجدول نلحظ ان التركيز 10^5ملغم /لتر قد اثر معنوياً في نمو الغزل الفطري واعطى اقل معدل لنمو الفطر بواقع 1.17 سم وقد اختلف عن بقية التراكيز المستخدمة 0 عينة المقارنة ، 10 ، 10^2 ، 10^3 و10^4ملغم /لترالتي لم تظهر أي اختلاف فيما بينها. اما التداخل بين مدة الحضن و التركيز فيشير الجدول نفسه الىان اقل معدل للنمو كان عند التركيز 10^5 ملغم /لترعند 5 ايام حضن و بواقع 0.62 سم في اليوم الخامس و اعلى معدل كان عند بقية التراكيز 0 ، 10 ، 10^2 ، 10^3 و 10^4ملغم /لترومنذ اليوم الخامس من الحضن.

الجدول (16):تأثيرمدة حضن (يوم) و تركيز K_2SO_4 و التداخل بينهما في معدل نمو الفطر *S. sclerotiorum*عند درجة حرارة 18 ± 2 º م و 5.6 pH وعلى وسط PDA.

التركيز ملغم/ لتر / مدة الحضن (يوم)	0	10	10^2	10^3	10^4	10^5	المعدل
5	9.00	9.00	9.00	8.50	9.00	0.62	7.50
7	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	1.10	7.60
10	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	1.80	7.80
المعدل	9.00	9.00	9.00	8.80	9.00	1.17	

L.S.D 0.05 :مدة الحضن = 0.24 التركيز = 0.34التداخل = 0.60

اما انتاج الاجسام الحجرية للفطر لم يتأثر عند مختلف التراكيز المستخدمة في التجربة باستثناء التركيز 10^5 ملغم / لتر الذي لم ينتج فيه الفطر اجسام حجرية حتى عند اليوم الثاني عشر و الذي يمثل نهاية التجربة. و كما موضح في الجدول (17).

الجدول (17):تأثيرمدة حضن (يوم) و تركيز K_2SO_4و التداخل بينهما في تخليق الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*على وسط PDA عند درجة حرارة 18 ± 2 º م و رقم هيدروجيني 5.6

التركيز ملغم / لتر / مدة الحضن (يوم)	0	10	10^2	10^3	10^4	10^5
5	-	-	-	-	-	-
7	I.	I.	I.	I.	I.	-
10	D.	D.	D.	D.	D.	-
12	M.	M.	M.	M.	M.	-

I. مرحلة البادئات Intiation - .D مرحلة التطور-Development مرحلة النضجMaturation

3-4- تأثيرنوع وتركيز منظمات النمو النباتية في نمو الفطر *S.sclerotiorum* وانتاجه للاجسام الحجرية :

1 - حامض الجبرليكGA_3:

اوضحت النتائج في الجدول (18)، ان لحامض الجبرليك تأثير في نمو الفطر*S.sclerotiorum* على وسط PDA و عند درجة حرارة 18± 2 ، و ان هناك فروقات معنوية بين مدة حضن فقد اختلفت مدة 5 ايام معنوياً عن 7 و 10 يوم ، اذ كان نمو الفطر في اقل معدلاته عند اليوم الخامس ، فيما لم تظهر مدة 7 و10 يوم اختلافاً فيما بينهما . و من الجدول

نفسه لم تؤثرالتراكيز 50، 100، 150 ملغم / لتر في نمو الفطر ولم تختلف عن عينة المقارنة 0 ملغم / لتر في حين حصل انخفاضا معنويا في نمو الفطر عند التراكيز 150 ، 200 و 250ملغم / لتر.اما بالنسبة للتداخل بين عاملي مدة الحضن والتركيز فقد وصل نمو الفطر الى اقل معدلاته عند التركيز250 ملغم / لتر بمعدل 3.87 سم في اليوم الخامس فيما كان اعلى معدل له عند التراكيز 0 ، 50 و 100منذ اليوم الخامس بواقع 9 سم والذي يمثل قطر الطبق كاملا . بينما وصل النمو الى 9 سم في اليومين 7و 10 من الحضن عند التركيز 150 ملغم / لتر.وكما و يمكن ان نلحظ حدوث اختلاف مظهريفي شكلالغزل الفطريولونه عند التركيز250ملغم / لتر وعدم قدرته على التجديد.

الجدول (18) :تأثيرمدة الحضن (يوم)و تركيز حامض الجبريليك(GA_3) و التداخل بينهما في نمو الفطر *S. sclerotiorum*على وسط PDA عند درجة حرارة 18 ± 2 °م و 5.6 pH

التركيز ملغم/ لتر / مدة الحضن (يوم)	0	50	100	150	200	250	المعدل
5	9.00	9.00	9.00	7.75	5.25	3.87	7.30
7	9.00	9.00	9.00	9.00	6.75	5.25	8.00
10	9.00	9.00	9.00	9.00	7.10	7.30	8.40
المعدل	9.00	9.00	9.00	8.56	6.36	5.47	

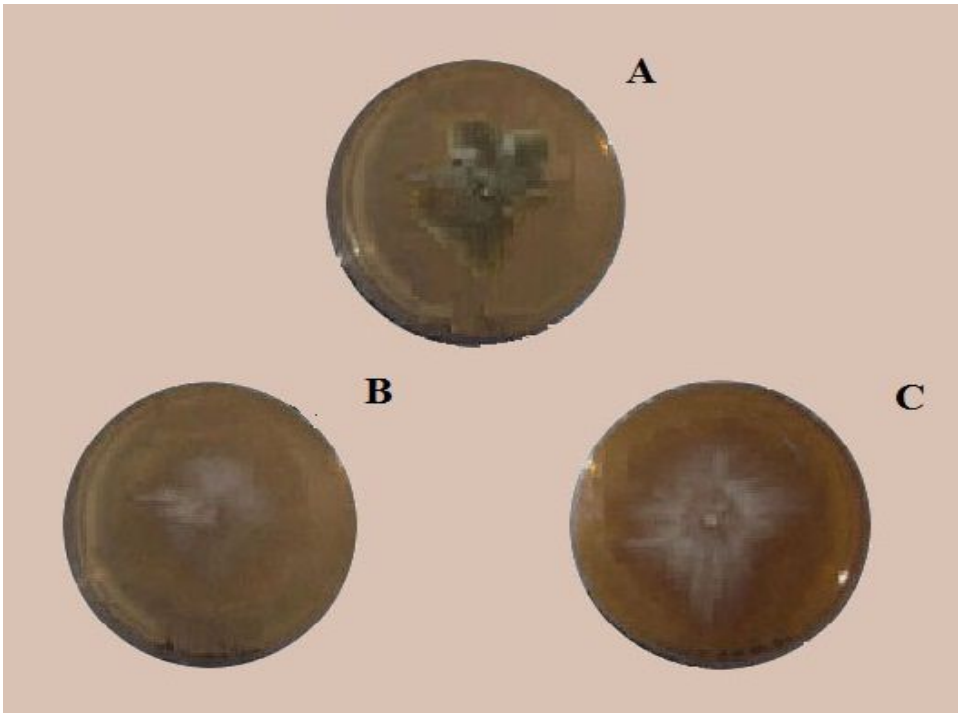
$L.S.D_{0.05}$:مدة الحضن =0.62التركيز = 0.88التداخل = 1.53

و تأثر انتاج الاجسام الحجرية بالتراكيز العالية من الحامض ،حيث تأخر انتاجها عند التركيز 200ملغم /لترلتبدأ بالظهور بشكل قليل جدا وصغيرة الحجم بمعدل اقل من 0.5 سم في اليوم العاشر ،في حين عجز الفطر عن انتاجها عند التركيز 250 ملغم/لتر اذ لم تظهر نهائيا طوال فترة التجربة التي استغرقت 12 يوما،فيما بقيت الاجسام الحجرية في مرحلة البادئات عند التركيز150و 200 ملغم / لتر ،اما التراكيز الاقل من 150 ملغم / لتر فلم يتضح اي تأثير لها في انتاج الاجسام الحجرية وكما موضح في الجدول (19) والشكل (4)

الجدول (19) :تأثيرمدة الحضن (يوم) و تركيز حامض الجبريليكGA_3ملغم /لتر و التداخل بينهما في انتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*على وسط PDA عند درجة حرارة 18 ± 2 ºم و 5.6pH

التركيز ملغم /لتر / مدة الحضن (يوم)	0	50	100	150	200	250
5	-	-	-	-	-	-
7	I.	I.	I.	-	-	-
10	D.	D.	D.	I.	I.	-
12	M.	M.	M.	I.	I.	-

I. مرحلة البادئات Intiation - .D مرحلة التطور-Development مرحلة النضجMaturation



الشكل (4):تأثيرالتراكيز العالية من حامض الجبريليك(GA_3)في نمووانتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*على وسط PDA عند درجة حرارة 18± 2 ºم و 5.6 pH بعد 12 يوما من الحضن.

A- غزل فطري مشوه عند التركيز 250 ملغم / لتر

B- غزل فطري مع اجسام حجرية في مرحلة البادئاتتركيز 200ملغم / لتر

C-غزل فطري مع اجسام حجرية في مرحلة البادئاتعند تركيز 150ملغم / لتر

2 - حامض السلساليك SA :

يتضح من الجدول (20)، عدم وجود فرق معنوي بين مدة الحضن 5 و 7 ايام ، و اختلفت مع مدة الحضن 10 يوم ، اذ سجل الفطر اعلى معدل للنمو عند اليوم العاشر ، فيما كان اقل معدلا له عند اليوم الخامس و بواقع 2.97 سم . و سجل التركيز 50 ملغم / لتراختلافامعنويا عن كل التراكيز الاعلى في حين لم يظهراختلافا عن عينة المقارنة (0) ملغم / لتر، ووصل نمو الفطر الى اقل معدلاته عند التركيزين 200 و250ملغم / لترو بواقع 2.45 و1.21 سم على التوالي ، في حين كان اعلى معدل للنمو هو عند التراكيز 0 ، 50 ملغم / لتر. اما التداخل بين عاملي مدة الحضن والتركيز ،فقد سجل الفطر اعلى معدل نمو عند التراكيز 50 ملغم / لتر في اليوم الخامس من الحضن ولم يختلف عن عينة المقارنة في نفس مدة الحضن والتركيز، واقل معدل للنمو كان عند التركيزين 150 و250 ملغم / لتر عند اليوم الخامس من الحضن . اما في اليوم العاشر من الحضن فلم تختلف التراكيز 150،100،50 ملغم / لترفي معدل النمو قياسا بمعاملة المقارنة0ملغم / لتر.

الجدول (20) :تأثيرمدة الحضن (يوم) وتركيز حامض الساليسيك (SA) ملغم / لتر و التداخل بينهما في نمو الفطر*S. sclerotiorum*على وسط PDAعند درجة حرارة 18 ± 2 °م و 5.6 pH

التركيز ملغم / لتر / مدة الحضن	0	50	100	150	200	250	المعدل
5	8.50	9.00	0.12	0.00	0.25	0.00	2.97
7	9.00	9.00	3.60	5.60	2.12	0.00	3.38
10	9.00	9.00	8.75	9.00	5.00	3.65	7.40
المعدل	8.80	9.00	4.15	4.86	2.45	1.21	

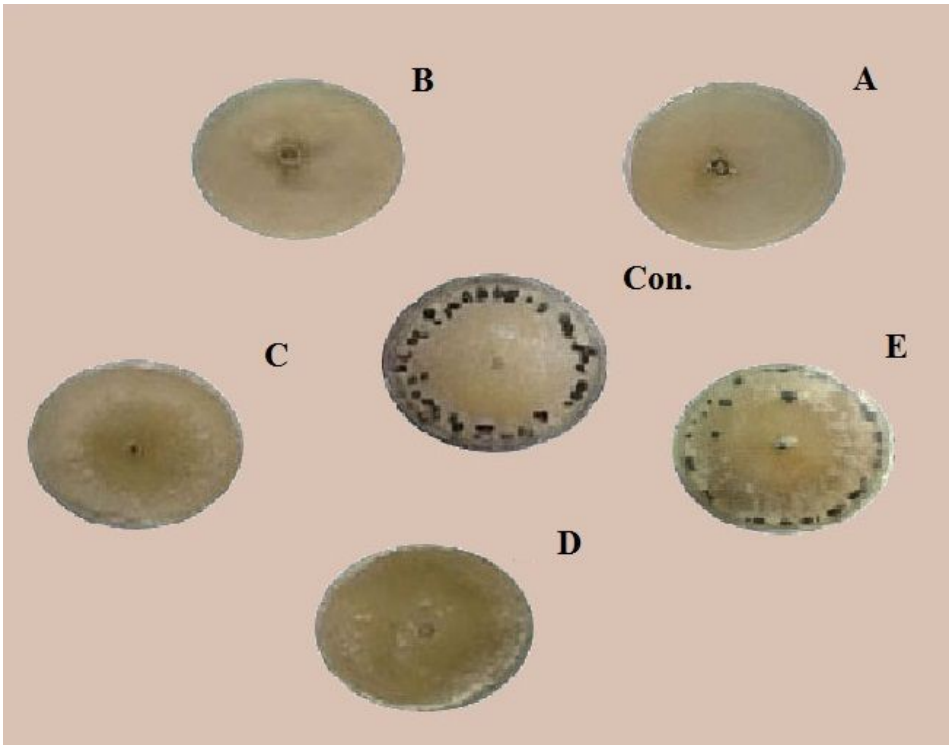
$L.S.D_{0.05}$:مدة الحضن = 0.52 التركيز = 0.82التداخل = 1.42

ومن الجدول (21)والشكل(5)، فان هنالك تأثير لتركيز حامض السلساليك في انتاج ونشوء الاجسام الحجرية فلم تسجل التركيز العالية من الحامض انتاجاً للاجسام الحجرية و تباطأ انتاجها عند التركيز 100 ملغم / لتر و لم يتأثر الانتاج الطبيعي للاجسام الحجرية عن عينة المقارنة و التراكيز الواطئة من الحامض .

جدول (21):تأثيرمدة الحضن (يوم) وتركيز حامض الساليسيك (SA)ملغم / لترو التداخل بينهمافي انتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum*على وسط PDA عند درجة حرارة 18 ± 2 ºم و 5.6 pH

التركيز ملغم / لتر / مدة الحضن(يوم)	0	50	100	150	200	250
5	-	-	-	-	-	-
7	I.	I.	-	-	-	-
10	D.	D.	I.	-	-	-
12	M.	M.	I.	-	-	-

I. مرحلة البادئات Intiation - .D مرحلة التطور-Development مرحلة النضجMaturation



شكل (5) تأثير التراكيز العالية من حامض الساليساليك(SA) في نمو وانتاج الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* على وسط PDA عند درجة حرارة 18± 2 ºم و 5.6 pH بعد 12 يوما من الحضن.

A-تركيز250ملغم / لتر

B – تركيز200ملغم / لتر

C– تركيز 150ملغم / لتر

D–تركيز 100ملغم / لتر

E- تركيز50ملغم / لتر

Con.- 0 ملغم / لتر (معاملة سيطرة)

4- 4 تقدير كمية حامض الاوكزاليك Oxalic Acid المنتج من قبل الفطر:-

4-4-1 - بتأثير العوامل البيئية:

اظهرت النتائج في الجدول (22) ،ان هناك تأثيرا معنويا لدرجة الحرارة ، اذ ارتفعت كمية الحامض المنتج عند ارتفاع درجة الحرارة الى 25ºم ، وسجل الحامض اعلى انتاج له كان عند هذه الدرجة بمعدل 7.46 ملغم .فيما سجل انخفضاً واضحاً عند زيادة دراجات الحرارة ليسجل اقل معدل لانتاجه عند درجة حرارة 30 و 35°م بواقع 0.00 ملغم .

اما مستوى الـpH فقد كان له تأثير معنوي في انتاج الفطر لحامض الاوكزاليك ، فقد سجل اعلى انتاج عند مستوى 5.5 pH .في حين لم يكن الاختلاف معنوياً عند كل من 7.5 و 9.5 pH في حين لم ينمو الفطر على الاوساط السائلة بإستثناء الوسط PDB السائل و كما موضح في الجدول (22).

جدول (22):تأثير درجة الحرارة ºم ونوع الوسط و الـ pHفي كمية حامض الاوكزاليك المنتج (ملغم) من قبل الفطر *S.sclerotiorum*

كميةالحامض Mg	نوع الوسط	كميةالحامض mg	pH	كميةالحامض Mg	الحرارة Cº
6.43	PDB	6.43	5.5	6.43	Cont.(20)
0.00	CDB	3.4	3.5	7.46	25
0.00	MB	1.77	7.5	0.00	30
0.00	NB	1.45	9.5	0.00	35
1.6	المعدل	4.57	المعدل	3.18	المعدل
4.48	L.S.D	8.27	L.S.D	2.776	L.S.D

4-4-2بتأثيرالعوامل الكيميائية:

يتضح من الجدول (23) ،ان هناك انخفاضا معنويا في كمية الحامض المنتج من قبل الفطر *S. sclerotiorum*و تحت تأثيرتراكيز مختلفة من الاملاح المختلفة، و سجل ملح $CaCO_3$اعلى تأثيرا ،اذ بلغ اقل معدل1.6 ملغم، فيما كان اعلى معدل لانتاج الحامض هو على الوسط الحاوي على K_2SO_4. كما وان هنالكتأثيرا معنويااللتركيز في انتاج الحامض ، فقد بلغ اقل معدل لانتاج الحامض عند التركيز10^5 ملغم / لتربواقع 1.52ملغم ، في حين ان اعلى معدل لانتاج الحامض كان عند عينة المقارنة (0) والتي اختلفت معنويا عن التركيز 10^3ملغم / لتر .ومن الجدول نفسه نلاحظ تأثير التداخل لعاملي نوع الملح و التركيز،اذ بلغ اعلى قيمة عند التركيز10^3 ملغم/ لتر لـ$(NH_4)_2SO_4$بكمية انتاج 7.08 ملغم، فيما كان اقل معدل عند التركيز10^5ملغم/ لتر لكل من الملحين$CaCO_3$ و$(NH_4)_2SO_4$)اللذين لم يحصل انتاج للحامض فيهما .

جدول (23):تأثير نوع الملح و التركيز و التداخل بينهما في كمية الحامض ملغم المنتج من قبل الفطر *S. sclerotiorum* عند درجة حرارة 18 ± 2 مº و 5.6 pH

التركيز ملغم/لتر / نوع الملح	0	10^3	10^4	10^5	المعدل
$CaCO_3$	6.43	0.00	0.00	0.00	1.60
K_2SO_4	6.43	4.60	4.55	4.57	5.03
$(NH_4)_2SO_4$	6.43	7.08	2.95	0.00	4.11
المعدل	6.43	3.89	2.50	1.52	

$L.S.D._{0.05}$: التركيز = 0.92 الاملاح = 0.80 التداخل = 1.60

4-4-3- تأثير منظمات النموالنباتية :

اظهرت النتائج في الجدول (24)، ان كمية حامض الاوكزاليك المنتج من قبل الفطر *S. sclerotiorum*قد تأثرت بنوع منظم النمو فقد كان حامض الجبرليك هو الاكثر تأثيراً في انتاج حامض الاوكزاليك من قبل الفطر اذ انخفضت كمية الحامض المنتج تحت تأثير حامض الجبرليك بشكل اكبر مما هو عليه بالنسبة لحامض السلساليك ، اما بالنسبة الى التراكيز المضافة من منظمات النمو النباتية فشكل التركيز200ملغم / لتر التأثيرالاكبر ، وسجل الفطر اقل كيمة انتاج للحامض عند هذا التركيز ، بينما كان التركيز 0 ملغم / لتر(عينة المقارنة) و تلاه التركيز 150 ملغم / لتركأعلى كمية انتاج. ومن التداخل نلحظ ان حامض الجبرليك عند التركيز250ملغم

/ لترسجل اقل مستوى لانتاج الحامض اذ لم يتمكن الفطر من انتاجه بشكل كامل و اختلفت معنوياً عن كل التراكيز الأخرى ، ومن جهة اخرى فقد كان اعلى انتاج هو عند التركيز150ملغم / لتر لحامض السلساليك.

الجدول (24):تأثيرنوع منظم النمو والتركيز (ملغم / لتر) و التداخل بينهما في كمية الحامض المنتج (ملغم)من قبل الفطر *S. sclerotiorum* على وسط الـ PDAعند درجة حرارة18± 2ºم و 5.6 pH

التركيز ملغم / لتر / نوع منظم النمو	0	150	200	250	المعدل
GA_3حامض الجبريليك	6.43	1.13	1.14	0.00	2.17
SAحامض الساليسيليك	6.43	6.70	2.30	3.50	4.73
المعدل	6.43	3.91	1.72	1.75	

$L.S.D._{0.05}$:التركيز= 0.14 منظم النمو = 0.10 التداخل = 0.20

الفصل الخامس

المناقشة The Discussion

1-5 التشخيص باستخدام تقنية PCR:

اظهرت العزلة الفطرية نتيجة موجبة وكان البادئ متخصصا للمنطقة المعروفة باسم (ERIC1REntrobacterial Repetitive Intergenic)وللسلالة (MCG) وضمن الموقع (475 Bp) وهذا مايجعل النتيجة مؤكدة ومتوافقة مع تشخيص الفطر مظهريا. وتتفق هذه النتائج مع ماذكرهSafaieو جماعته (2012)عند استخدام البادئنفسه للقطعة الجينية و التي ذكر انها تقع ضمن المدى (270-Bp 4300).

2-5-تأثير بعض العوامل البيئية والكيميائية في نموالفطروانتاج الاجسام الحجرية:

1-2-5 درجة الحرارة :

تعد درجة الحرارة من اهم العوامل البيئية المؤثرة في معدل نمو الفطروتكاثره ، ولكل فطر مدى حراري مفضل للنمو و التكاثر ، و يتأثرالفطر *S. sclerotiorum* بشكل ملحوظ عند حدوث ارتفاع او انخفاض عن المدى المفضل له (Dillard و اخرون ، 1995). واظهرت النتائج ان للفطر*S. Sclerotiorum* مدى حراري يتراوح من 10-25ºم مفضل للنمو و انتاج الاجسام الحجرية ، يتوقف نموه عند 35ºم بشكل كامل . وهذا يتفق مع ما ذكرهDohroo وCoung(2006)اذ بينا ان نمو الفطر وانتاجه للاجسام الحجرية يكون باعلى معدلاته عن درجة الحرارة 15- 20ºم و يضعف بشكل تدريجي عند 25ºم ليتوقف عند 35ºم. كما تتفق مع ما توصل اليه كل منLiew و Prange (1994)في ان درجة الحرارة 16ºم تعد هي الحرارة المثلى لنمو الفطر خضريا و ان الفطر قادر على النمو و انتاج الاجسام الحجرية حتى 35ºم ،اماHartman و جماعته (2004)فقد ذكر ان للفطر قدرة على النمو بشكل طبيعي و احداث الامراضية على نبات فول الصويا عند درجة حرارة 25- 30ºم. وقد يعود هذا الاختلاف النسبي الى ظروف تجريبية و وراثية مثل اختلاف نوع العزلة او اختلاف المنطقة الجغرافية التي اخذت منها كل عزلة و ان هذا التأثير قد يكون ناتجا من حصول خلل في النشاط الايضي و الانزيمي للفطر اذ ان الارتفاع في درجات الحرارة يمكن ان يؤدي الى تحطيم عدد من الانزيمات مثل انزيم pectinaseو انزيم Polygalacturonase وغيرها (Motallebi و اخرون ، 2008 ؛Rehman ، 2009).

2-2-5 الرقم الهيدروجيني الـ pH:

يعتبر الرقم الهيدروجيني عاملاً بيئياً مهم في نمو الفطر وتطوره، وان التغيرات التي تحصل في قيمة الرقم الهيدروجيني يمكن ان تؤثر في نشاط وفعالياته الحيوية المختلفة كنمو الغزل الفطري، و انتاج الاجسام الحجرية والقدرة على احداث الامراضية على النبات العائل،(Bolton و اخرون ، 2006). واظهرت النتائج ان الفطر*S.sclerotiorum*يمتلك القدرة على النمو في مدى واسع من الرقم الهيدروجيني يتراوح من 3.5 – 10.5. في حين ان انتاج الاجسام الحجرية ونضجها كان ينحصر عند الرقم الهيدروجيني الحامضي 3.5 – 6.5 فقط . وهذا يتوافق مع ما ذكرهDohroo و Coung (2006) ، اذ بين ان الفطر قادر على النمو في مدى يتراوح4.0 – 8.0 من الرقم الهيدروجينيوان انتاج الاجسام الحجرية يضعف تدريجيا باتجاه القاعدية (اعلى من pH 7.0).واتفقت هذه النتائج مع ما توصل اليه كل منAgnihotri و Rai (1971)، اذ بينا ان للفطر مدى واسعاً من الرقم الهيدروجيني (pH 2.5– pH 9.5)مناسب لنمو الغزل الفطري ، اما انتاج الاجسام الحجرية فهو يفضل الرقم الهيدروجيني الحامضي ويقل انتاجها تدريجيا عندpH 7.5 ليتوقف كليا عندpH 8.0.وذكرBolton و جماعته (2006)ان الرقم الهيدروجيني الحامضي هوالمفضل لانتاج الاجسام الحجرية للفطر وعند ارتفاع الرقم الهيدروجيني الى القاعدي فان الفطر يقوم بانتاج كميات كبيرة من حامض الاوكزاليك على الوسط لتنخفض قيمة الرقم الهيدروجيني الى الحامضي من جديد والذي يعد مناسباً للنمو و عمل العديد من الانزيمات الضرورية لانتاج الاجسام الحجرية مثل انزيم (MAPK)-Mitogen Activated Protein Kinase المرافق لبناء الاجسام الحجرية.

كما ان الاختلاف في الرقم الهيدروجيني يمكن ان يؤثر ايضا في انتاج الاجسام الحجرية للفطر من خلال التأثير في بناء صبغة الميلانين Melanin التي لها الدور الاكبر في نضج الاجسام الحجرية وذلك من خلال التأثير في نشاط وفعالية عدد من الانزيمات الضرورية لبنائها (Butler و اخرون ، 2009). كما يمكن ان يؤثر ايضا في جاهزية وعمل الانزيمات الضرورية لاختراق النبات واحداث الامراضية عليه مثل انزيم pectinaseو انزيم cellulose(Motallebi و اخرون ، 2008).

3-2-5 نوع الوسط الغذائي:

تختلف قدرة الفطر بشكل عام على النمو على الاوساط الزرعية المختلفة ، ويعود هذا الى الاختلاف في مكونات الوسط الغذائية ونسبها وطبيعتها الكيميائية في الوسط ، مثل الاختلاف في مصدر الكاربون المضاف للوسط و جاهزية بعض العناصر الكيميائية الضرورية كالنيتروجين و الفوسفور (Buenoو اخرون،2012). ولوحظ من خلال الدراسة ان افضل وسط لنمو الفطر *S.sclerotiorum* و انتاج الاجسام الحجرية هو وسط اكار دكستروز البطاطا PDA ،و قد يعود هذا الى وجود كميات كبيرة من سكر د . كلوكوز D- Glucose و سكر الدكستروز و التي تعد مصدر كاربون مفضل للفطر كذلك ان خلاصة البطاطا التي تحتوي على معظم العناصر الضرورية لنمو الفطر (Peres و اخرون،2002) . ويليه وسط الزابك اكارCADبمعدل نمو قليل جدامع تباطؤ لتخليق الاجسام الحجرية .ويليهما وسط الاكار المغذي NA.وهذه النتائج متفقه مع ما ذكره(2001) Mohamed اذ بين ان الوسط PDA هو المفضل لنمو الفطر وانتاج الاجسام الحجريةويليه وسط الاكار المغذي NA في حين ان الوسط CDA يعد اقل الاوساط تفضيلا من قبل الفطر وقد يعود هذا الاختلاف الى عوامل كيميائية كتراكيز المكونات العضوية للوسط و توفر عدد من العناصر التي قد تعمل على تحفيز نمو الفطر و تثبيطه . كما وذكرKim و اخرون (2006) ان وسط PDA هو افضل وسط لنمو الفطر *S.sclerotiorum*وانتاج الاجسام الحجرية في 10 ايام فقط لجاهزية معظم العناصر الغذائية الضرورية للفطر.

: $(NH_4)_2SO_4$-4-2-5

يعتبر استخدام الاسمدة النباتية من اهم مقومات الزراعة الناجحة ولاسيما تلك الاسمدة الغنية بعنصر النيتروجين ،اذ يعمل كعامل محفز لنمو النبات من جهة ومضاد فطري لبعض الفطريات الممرضة للنبات من جهة اخرى (Peltier و اخرون،2012). و اظهرت النتائج ان التراكيز العالية (اعلى من 10^3 مغلم / لتر) من املاح الامونيوم الحاوية على النيتروجين لها تأثير معنوي في نمو الفطر و كذلك يمكن ان تؤثر في انتاجه للاجسام الحجرية ، و تتفق هذه النتائج معToorو اخرون(2004) قد ذكروا ان سلفات الامونيوم يمكن ان تساهم في قتل الاجسام الحجرية للفطر *Sclerotiumrolfsii*وعدم انباتها فضلاً عن قدرتها التثبيطية للفطر .و كما بين كل منLandschoot و McNitt (1997)وLiu و اخرون(1995) الى ان اضافة عنصر النيتروجين بشكل املاح الامونيوماو بشكل سماد نيتروجيني يمكن ان تؤثر معنويا في مرض بقعة الدولار dollar spot المتسبب عن الفطرين *S. sclerotiorum* .Sو الفطر *S. homoeocarpa*. في حين ذكرDernoeden و Davis (2002)ان اضافة النيتروجين ليس لها دور في مقاومة الفطر الممرض على النبات ما لم يتوفر عنصر الكاربون وبنسب محددة من

النيتروجين العضوي وقد يعود هذا الاختلاف في النتائج الى مصدر النيتروجين المستخدم في الدراسة وكذلك عوامل بيئية و وراثية .وذكر كل منFernando و Ramarathnam(2005)ان زيادة من المركبات النيتروجينية بوجود البكتريا يؤدي الى زيادة انتاج المركبات العضوية المتطايرة في الوسط و التي تعمل كعامل مثبط للفطر.

ويرى كل منBonanomi و اخرون(2010)وTenutaو Lazarovits (2004)ان الدور الذي يلعبه النيتروجين في مقاومة العوامل الممرضة على النبات لا يعود بالضرورة الى الفعل السام على الفطر بل ايضا ان امتصاص كميات كبيرة من النيتروجين من قبل النبات يؤدي الى زيادة بناء المركبات الفينولية في النبات والتي تؤثر في الفطريات الممرضة مما يزيد من مقاومة النبات للفطر، كما و ان شكل المركب النيتروجيني يمكن ان يؤثر في الرقم الهيدروجيني لبيئة الفطر مما يؤدي الى عدم ملائمتها للفطر وبالتالي عدم قدرته على النمو.

:$CaCO_3$ --5-2-5

يستعمل الجبس Lime عادة في تصحيح حامضية التربة وان اضافته الى التربة يمكن ان يقلل حساسية النبات الى الانظمة الممرضة (Valeو اخرون،2000). ويلعب الكالسيوم دورا مهماً في دفاعات النبات ضد فطر *S.sclerotiorum* حيث يمثل مكوناً اساسياً في بناء الصفيحة الوسطى لجدار الخلية النباتية وعند انتاج الفطر لحامض الاوكزاليك يعمل الحامض على منع امتصاص الكالسيوم من قبل النبات مما يقلل من قوة الجدار الخلوي cell wallللخلية النباتية . واشارت النتائج الى عدم وجود تأثير لأيون الكالسيوم في قطر مستعمرة الفطر *S.sclerotiorum*عند كل التراكيز المستعملة في الدراسة ، ولكن لوحظ حدوث تشوه شكل المستعمرة الفطرية عن الطبيعي مع اختزال في بناء الاجسام الحجرية للفطر . و تأتي هذه النتائج خلافا مع ما ذكرهJúnior و اخرون(2009)، اذ بين ان لكل من كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ و سيليكات الكالسيوم $CaSiO_3$ قدره معنوية على اختزال نمو الفطر حتى عند تراكيز منخفضة (200 , 300, 400 مغلم / لتر) في حين لم يظهر في دراسته أي تأثير يذكرضد الاجسام الحجرية للفطر او الشكل المظهري للمستعمرة.

كما و بينTolba و Mohamed (2002)ان استخدام هيدروكسيد الكالسيوم وبتركيزppm 5000 يمكن ان يؤثر في نمو وانتاج الاجسام الحجرية والوزن الجاف للاجسام الحجرية ايضا للفطر ، فيما ذكرAhari و اخرون(2008) ان اضافة ايون الكالسيوم بشكل حر

يمكن ان يؤدي الى اختزال نمو الفطر و كذلك انخفاض قدرة الاجسام الحجرية على الانبات الخضري و الجنسي. وقد يعود هذا الاختلاف في النتائج الى اختلاف في الظروف التجريبية كنوع المركب المستخدم في كلا الدراستين و كذلك طريقة اضافة المركب او عوامل وراثيةكالاختلاف في نوع العزلة و المنطقة الجغرافية التي اخذت منها.

:K_2SO_4-6-2-5

تمتلك املاح البوتاسيوم القدرة على العمل كمضاد للفطريات الممرضة على النبات او التقليل من السموم المنتجة من قبلها ، ومنها كلوريد البوتاسيوم (KCl) و كاربونات البوتاسيوم($KHCO_3$) (Olivier و اخرون، 1999) و اظهرت النتائج ان لسلفات البوتاسيوم قدرة اختزال نمو الفطر *S.sclerotiorum* و كذلك التقليل من قدرة الفطر على انتاج الاجسام الحجرية عند التراكيز العالية (10^5 مغلم / لتر) و تباطئ نضجها. وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليهErper و اخرون (2011)اذ بين ان التركيز العالية من املاح البوتاسيوم(200 , 100 ملي مول) تعمل على اختزال نمو الفطر و التقليل من معدل نموه.في حين لاحظSoltan و اخرون (2010)ان سلفات البوتاسيوم قد ادت الى انخفاض قليل في معدل نمو الغزل الفطري للفطر *S.sclerotiorum* و الفطر *Botrytis cinerea*مقارنة بكاربونات و كلوريد البوتاسيوم مع زيادة في حاصل الاجسام الحجرية المنتجة من قبل الفطر *S.sclerotiorum* .

وبينErper و اخرون (2011) ان لكاربونات البوتاسيوم القدرة على اختزال نمو الفطر عند التراكيز العالية و كذلك الحد من انتاج الاجسام الحجرية للفطر حتى عند التراكيز الواطئة من المركب (mM 75, 25 , 10). ان زيادة الايونات الحرة لعنصر البوتاسيوم في بعض الاحيان قد تؤدي الى تكوين اواصر تساهمية مع عدد من الجزيئات الحية في الخلية الفطريةكالانزيمات و البروتينات الناقلة في الغشاء البلازمي محدثا اعاقة لعمليات النقل التي تحدث على الغشاء مما يؤثر في نفاذية الغشاء البلازمي بشكل خاص و في العمليات الحيوية للفطر بشكل عام (Dłużniewska، 2008).

3-5- تأثيرنوع وتركيز منظمات النمو النباتية في نمو الفطر *S.sclerotiorum* وانتاجه للاجسام الحجرية :

1- حامض الجبرليك GA_3:

يعدالدور الذي يلعبه حامض الجبرليك فيمقاومة الفطريات الممرضة غير واضح بشكل تام على الرغم من ان مستوياته في النبات تتغير عند اصابة النبات بفطر ممرض ، وكذلك تبعاً لحساسية و مقاومة النبات للمرض (Alam و اخرون، 2004).واظهرت نتائج هذه الدراسة ان لحامض الجبرليك قدرة معنوية على اختزال نمو الفطر*S.sclerotiorum* وعند كل من التراكيز200 , 250 مغلم / لتر و كذلك تباطؤ نضج الاجسام الحجرية للفطر عند التراكيز 150 ,200 و 250مغلم / لتر واختفائها بشكل تام في بعض الاحيان. و تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليهAl-masri و اخرون(2002)اذ لاحظ انخفاضاً معنوياً في نمو الفطر*S.sclerotiorum* عند التركيز 200 مغلم / لتر. في حين لم تظهر التراكيز الاقل من100 مغلم / لترقدرة على اختزال نمو الفطر.وهذاخلاف لما توصل اليهBucio-villalobos(2005)حيث بين حامض الجبرليك قد ادى الى زيادة معنوية في نمو كل من الفطرين *Aspergillusnidulans*و *A. parasiticus* وانتاجهما للسموم . فيما اتت نتائجAl-masri(2000)مبينة ان لحامض الجبرليك تأثيراً ايجابياً في نمو الفطر *S.sclerotiorum* وذلك من خلال تحفيز الفطر على انتاج انزيم الاميليز من قبل حامض الجبرليك مما يؤدي الى زيادة الكلوكوز في الوسط المغذيو الذي يعد مصدراً غذائياً اساسياً للفطر.

ويعتقدTomita و اخرون(1984)ان للجبرلينات تأثيراً مباشراً في ايض الكاربون و النيتروجين من قبل الخلية الفطرية مما يؤثر في تنظيم عملية تبادل العناصر الضرورية بين داخل وخارج الخلية مما يعيق نمو الغزل الفطري او يؤدي الى حدوث نمو مفرط . و للجبرلين تأثير في التعبير الجيني لعدد من الانزيمات المحددة لامراضية الفطر وبناء عدد من البروتينات الضرورية لحيوية الفطر (Tudzynski و Holter،1998).

2 -حامض السلساليك :

استخدم حامض السلساليكفي تحفيز النباتات على المقاومة الجهازية واشتراكه في الدفاع ضد المسببات المرضية (الكوراني و فياض، 2011) . واظهرت نتائج هذه الدراسة قدرة الحامضمعنويا على اختزال نمو الفطر *S.sclerotiorum* عند التراكيز 100- 250 مغلم / لتر مع اختزال واضح في تخليق الاجسام الحجرية للفطر . تأتي هذه النتائج متفقة مع ما توصل اليهHadi و Balali (2010)اذ بينا ان لحامض السلساليك قدرة على اختزال نمو الفطر *Rizhoctiniasaloni*عند التركيز 0.2mM ونسبة 73% وتزداد هذه النسبة عند زيادة التركيز وزمن التعرض للحامض مع انخفاض في معدل انتاج الاجسام الحجرية للفطر على درنات البطاطا . و ذكرRahamah و اخرون(2012) ان هناك انخفاض واضح في نمو الغزل الفطري

للفطر *Ganodermaboninense* عند استخدام هذا المركب مع ايوني الكالسيوم و النحاس و يزداد هذا التأثير طرديا بزيادة التركيز و كذلك بين ان استخدام الحامض لوحده يمكن ان يؤثر معنويا في نمو الفطر حتى عند التراكيز الواطئة 50- 200 مغلم / لتر مع بطئ في انتاج الثمار البازيدية للفطر و التي تكون ذات احجام متباينة تحت تأثير الحامض . وخلافا لما ذكر فقد ذكر الكوراني و فياض (2011) ان الحامض لم يظهر أي قدرة معنوية ضد الفطر *Fusariumoxysporum*Schl*f.sp. lycopersici* عند التراكز المذكورة سلفا فيما كان له تأثير معنوي فقط عند التراكيز الاعلى من 500 مغلم / لتر.

ويذهب كل منZhang و اخرون (2012)وMauch-Mani و Metraux(1998)ان ليس لحامض السلساليك أي قدرة للتأثير في الفطر الممرض نفسه بل هو يحفز قدرة النبات على مقاومة الممرض من خلال تقليل فعالية Ascorbic Peroxidase مما يؤدي الى زيادة في مستويات H_2O_2 و ينتج عن هذا بلمرة المركبات الفينولية الى مركبات تشبه اللكنين lignin-like مما يزيد من قدرة النبات على المقاومة.

5-4- تقدير كمية حامض الاوكزاليك Oxalic Acid المنتج من قبل الفطر:

1-4-5 بتأثير العوامل البيئية:

يعد حامض الاوكزاليك من الاحماض العضوية التي تنتجها الفطريات بشكل دائم و على الاوساط السائلة و الصلبة ، و يتأثر انتاج هذا الحامض تأثرا مباشرا بالعوامل المؤثرة في نمو الفطر المنتج له (Jarosz-Wilkolazka و Gadd، 2003; Munir و اخرون، 2001). واظهرت النتائج ان ارتفاع درجات الحرارة الى مستويات غير المناسبة لنمو الفطر (30-35°م) قد ادت الى اختلاف قدرة الفطرة على انتاج حامض الاوكزاليك اذ ارتفعتكمية الحامض المنتج عند درجة الحرارة 25° م الى 7.46ملغم فيما لم يتمكن الفطر من انتاج الحامض عند 30° و 35°م. و اختلفت هذه النتائج مع ماتوصل اليهSmith (2004) اذ بين قيمة الحامض المنتج من قبل الفطر*S.minor* قد انخفضت من 4.19ملي مول عند درجة حرارة 25°م الى 0.22 ملي مول عند درجة حرارة 29°م. وذكرBeaulieu (2008)ان المدى الحراري 15- 25°م يعد مفضلاً للفطر *S. homoeocarpa*للنمو الطبيعي وانتاج اكبر كمية من الحامض .

اما مستوى الرقم الهيدروجيني فقد بينت النتائج وجود اختلاف معنوي في قدرة الفطر على انتاج الحامض. اذ ارتفعت الى اعلى معدلاتها عند3.5و 5.5 بواقع 5.5 و6.43ملغم على التوالي ، وهذا يأتي خلافاً مع ما ذكرهBeaulieu (2008) و كل من Dickman و Rollins

(2001)اذ بين كل منهما ان الوسط القاعدي يعد مفضلاًللفطر*S. homoeocarpa* و الفطر *S.sclerotiorum*لانتاج اكبر كمية من الحامض عند درجات الحرارة المناسبة للنمو الخضري ،و في السياق نفسه فقد اتت هذه النتائج خلافاً لما بينه Micales (1995)اذ ذكر ان اقل انتاج للحامض بالنسبة للفطر *Postia placenta*يكون على الوسط الحامضي اذ لوحظ انخفاض كمية الحامض من3.02 ملي مولعند 5.5pH الى 0.04 ملي مول عند 3.0pH.اما اختلاف نوع الوسط فلم يكن هنالك قدرة للنمو عند الاوساط المختلفة وقد يعود هذا الى الاختلاف في المكونات الكيميائية كاختلاف مصدر الكاربون في الوسط وعدم ملائمتها لنمو الفطر او بسبب عوامل بيئية محضة. و يعتقدBeaulieu(2008) ان هنالك ارتباط معنوي بين معدل النمو و انتاج الحامض اذ ان انتاج الحامض يزداد طرديا بزيادة النمو الخضري للفطر. كما وان اختلاف مصدر الكاربون وعدم جاهزيته في الوسط يؤدي الى زيادة مفرطة في انتاج الحامض لتوفير رقم هيدروجيني و وسط ملائم لعدد من الانزيمات الضرورية لنمو الفطر (Micales، 1995).

2-4-5 بتأثير العوامل الكيميائية:

تتأثر امراضية الفطر بـفعل الايونات و العناصر الموجودة في بيئة الوسط وذلك من خلال تأثيرها في نشاط الانزيمات التي ينتجها الفطر على الوسط كما وتنتج بعض الاجناس الفطرية حامض الاوكزاليك بشكل اوكزلات مرتبطة بانزيمات محددة مثل انزيم oxaloacetase و انزيمoxalate oxidase (Akamatsu و اخرون، 1993).واظهرت الدراسة ان انتاج الحامض قد انخفض بشكل معنوي تحت تأثير المركبات التي درست ، وكان ايون الكالسيوم اكثرها تأثيرا ويليه النيتروجين ومن ثم البوتاسيوم . وتتفق هذه النتائج مع ما ذكرهMicales(1995) الذي لاحظ انخفاض واضح في الحامض المنتج من قبل الفطر *Postia placenta* تحت تأثير التراكيز الاعلى من 10^3مغلم / لتر (5ملي مول) لايون الكالسيوم في حين لم تظهر التراكيز الاقل اختلاف في قيمة الحامض اما ايون البوتاسيوم فقد اتت النتائج متفقة ممع ما توصل اليه الباحثنفسه ضمن الدراسةنفسها. وعلى النقيض من هذا فقد ذكرHastrupو اخرون(2006) ان الحامض يميل للتراكم عند اضافة ايون الكالسيوم بشكل مشترك مع ايون النحاسالى الوسط الذي ينمو عليه الفطر *Serpulalacrymans* أي ان الفطر يقوم بانتاج كميات اكبر من المعتاد تحت تأثيركلا المركبين وكذلك يتراكم الحامض ولكن بنسب اقل عند استخدام الكالسيوم بغياب النحاس.وخلافا لما ذكر فقد بينHumar و Pohleven(2005) ان قيمة الحامض للفطريات البازيدية basidiomycetesتنخفض بزيادة تركيز النيتروجين في الوسط .

ان وجود هذه الايونات وبشكل املاح في الوسط الذي ينمو عليه الفطر يمكن ان تعمل على تغيير الرقم الهيدروجيني للوسط للحامضي او للقاعدي وهذا يؤدي الى اختلاف قدرة الفطر

على انتاج الحامض اذ ان معظم الفطريات تفضل الوسط القاعدي لانتاج حامض الاوكزاليك اكثر من الحامضي ، كما ان انتاج الحامض يعتمد بشكل اساسي على كمية النيتروجين و جاهزيته في الوسط ويتأثر بها تأثير مباشر (Micales ،1995؛ Akamatsuو اخرون ، 1993 ؛Humar و Pohleven ، 2005).

5-4-3- تأثير منظمات النموالنباتية :

يعد تأثير منظمات النمو النباتية في قدرة الفطر على انتاج حامض الاوكزاليك غير واضح ولكن يمكن القول عن وجودارتباط مباشر بين معدل نمو الفطر وانتاجه للحامض اذ ان انتاج الحامض يزداد طرديا بزيادة النمو الخضري للفطر ، و يتأثر انتاج هذا الحامض تأثرا مباشرا بالعوامل نفسها التي تؤثر في نمو الفطر (Wilkolazka و Gadd، 2003 ؛Munir و اخرون، 2001). وبينت النتائج انخفاضاً معنوياً في كمية الحامض المنتج من الفطر تحت تأثير حامضي الجبرليك و السلساليك عن التراكيز 200 و 250 مغلم / لتر. ويمكن تفسير ذلك في ضوء عوامل فسيولوجية ووراثية خاصة بالفطر او عوامل بيئية كحامضية الوسط و غيرها.

الاستنتاجات و التوصيات:

الاستنتاجات : اظهرت نتائج الدراسة ما يلي

1- تعد درجة الحرارة 10- 20ºم والرقم الهيدروجيني الحامضي 3.5 - 6.5 هي العوامل المفضلة للفطر للنمو و انتاج الاجسام الحجرية sclerotia ، في حين يمثل الوسط PDA الوسط الافضل لنمو الفطر و انتاجه للاجسام الحجرية مقارنة مقارنة بكل من وسط المانيتول اكار و الزابك اكار و وسط الاكار المغذي .

2- تأثير التراكيز العالية من كاربونات الكالسيوم لا ينحصر في معدل نمو المستعمرة الفطرية ، بل له القدرة على احداث و اضرار و تشوهات في شكل الغزل الفطري وحيويته.

3- ان عزلات الفطر *Sclerotiniasclerotiorum* المشخصة بتقانة PCRلا تمتلك تغايراً وراثياً كبيراًاذ ان العزلة التي شخصت في العراق هي مماثلة لعزلات الفطر المتواجدة في دول الجوار.

4- عدم وجود نمط ثابت في انتاج الاجسام الحجرية للفطر اذ يمكن ان تختلف قدرة الفطر على انتاجها عند ثبات ظروف النمو واختلافها.

5- ان الغزل الفطري يمتلك قدرة عالية على تحمل الاختلاف في الرقم الهيدروجيني وذلك من خلال انتاجه لعدد من المركبات العضوية التي تعمل على ملائمة الوسط مثل حامض الاوكزاليك .

6- ان كمية حامض الاوكزاليك تتأثر طردياً بالنمو الخضري للفطر ،اذ ان تأثير منظمات النمو النباتية في انتاج حامض الاوكزاليك يتم من خلال التأثير المباشر في معدل نمو الفطر.

7- ان تأثير العامل المثبطقد لا يحدث بخفض معدل النمو الخضري فقط بل قد يكون مؤثراً في حيوية الفطر و قدرته الامراضية او انتاجه لعدد من المركبات العضوية.

التوصيات : ولكي تكتمل الدراسة حول الفطر *Sclerotiniasclerotiorum* يمكن ان نوصي بما يأتي :

1- دراسة موسعة لعدد اكبر من العزلات من مناطق مختلفة لغرض معرفة مدى التغاير الوراثي للفطر و عدد السلالات الاخرى.

2- دراسة العوامل الفسيولوجية المؤثرة بانتاج الاجسام الحجرية للفطر ولا سيما الانزيمات ومنها انزيم protein kinase الذي يعمل مرافقا لانتاج الاجسام الحجرية.

3- دراسة شاملة للعوامل البيئية و الكيميائية المؤثرة في نموه و انتشاره وتطوير المقاومة الذاتية في النبات من خلال الهورمونات النباتية.

4- دراسة انتاج الفطر للأبواغ الجنسية و العوامل المؤثرة فيه.

المصادر العربية:

الإمام ، محمد محمد الطاهر (2007) . تصميم وتحليل التجارب . دار المريخ للنشر ، المملكةالعربية السعودية ، ط1 : 408 صفحة.

الكوراني ، جوادين طالب عبد سلمان و فياض ، محمد عامر(2011). تأثير بعض عوامل الاستحثاث الكيميائية و الاحيائية في خفض اصابة نبات الطماطا بفطر *Fusariumoxysporum*Schl*f.sp. lycopersici* ، مجلة ابحاث البصرة ، 37(4) : 19- 30.

كاظم ، ساره كريم (2011). دراسة بعض الخصائص الحيوية و الجزيئية للفطر Fusarium spp. وتأثير بعض الظروف البيئية في نموه وتكاثره مختبرياً. رسالة ماجستير- كلية العلوم- جامعة بابل. 148 صفحة.

محمد ، بان طه (2001). دراسة حياتية للفطر *SclerotiniaSclerotiorum* (Lib.) De Bary و استخدام البسترة الشمسية في السيطرة عليه، اطروحة دكتوراه فلسفة ، كلية العلوم ، جامعة بابل ،87 صفحة

Reference: المصادر الاجنبية:

Abawi, G. S. and Grogan, R. G. (1975) .Source of primary inoculum andeffects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzeliniasclerotiorum*.Phytopathology 65: 300-309.

Abd el-hai, K. M. ;Metwally, M. A. and El-baz, S. M. (2010). redduction of soybean root and stalk rots by growth substance under salt stress condition , Plant Patholog Journal, 9(4): 149-161.

Agnihotri , j. p. and Rai , R . P. (1971).Influence of nutrition and phon growth and sclerotia formation of *SclerotiniaSclerotiorum* (Lib.) De Bary from gaillardia pulchellafoug. *Mycopathologia et mycologiaapplicata*, 43 : 89 – 95.

Agrios, G. N. (1997). Plant Pathology, Fourth Ed. Academic Press, San Diego.

Ahari , B. A. ; Mohammadi , E. and Aliasgharzadeh , N. (2008) .Effects of cations on biological control of *Sclerotiniasclerotiorum* by *Pseudomonas fluorescens* , Diversifying Crop Protection , 32 (Abstract).

Akamatsu, Y.; Takahasihi, M. and Shimada, M. (1993).Cell-free extraction of oxaloacetase from white-rot fungi, including *Coriolusversicolor*. Wood Res. 79, 1–6.

Alam, S. ; Lee, T. S. , Han, K. D. , Lee. K. M. ,Hur, H. , Shim, J. O. , Chang , K. C. and Lee, M. W. (2004). In vitro effect of plant extract, and phytohormons on mycelial growth of antheracnose fungi, mycobiology, 32(3): 134- 138.

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.

Al-Masri, M. I. (2000). Role of plant growth regulators in the interaction between phytopathogenicity of *SclerotiniaSclerotiorum* and their host plants, Thesis, Msc. College of Agriculture, Hebron University, : 90 pp. (abstract).

Al-Masri, M. I. ;Barakat , R. , Ali-Shtayeh, M. S. ,Elad, Y., Sharon, A. and Tudzynski , P . (2002) .Effect of plant growth regulators on white mould (*Sclerotiniasclerotiorum*) on bean and cucumber.*J. Phytopathology*, 150: 481– 487.

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 *Sclerotiniasclerotiorum* and *Botrytis cinerea*, PLoS Genetics, 7(8): 1-27.

Ayers, W.A. and Adams, P.B. (1981).Mycoparasitism and its application to biological control of plant disease.in biological control. In crop *Production Beltsville Symposium In Agricultural Research*, 5: 91–103.

Bateman, D. F. and Beer, S. V.(1965). Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and poly galacturonase during pathogenesis by *sclerotiumrolfsii* Photo Pathology Indian Agri. research Institute, New Delhi. 55: 204-211.

Beaulieu, R. A. (2008). Oxalic acid production by *Sclerotiniahomoeocarpa*: the causal agent of dollar spot,the undergraduate colleges of The Ohio State University, S. H. Thesis,

Boland, G. J. and Hall, R. (1994).Index of plant hosts of *Sclerotiniasclerotiorum*, *Can. J. Plant Pathol*. 16, 93–108.

Boland, G. J. and Smith, E. A. (1991). Variation in culture morphology and virulence among protoplast regenerated isolates of *Sclerotiniasclerotiorum*. *Phytopathol*., 81: 766 – 770.

Bolton, M. D. ;Thomma, B. P. H. J. and Nelson, B. D. (2006). *Sclerotiniasclerotiorum* (Lib.) De Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen, *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY*, 7(1) :1–16.

Bonanomi, G.; Incerti, G., Antignani, V., Capodilupo, M. and Mazzoleni, S. (2010). Decomposition and nutrient dynamics in mixed litter of Mediterranean species. Plant and Soil 331: 481–496.

Braun, E. L. ;Natvigb, D. O. , Werner-Washburneb, M. and Nelson, M. A. (2003). Genomics in *NeurosporaCrassa*: from one-gene-one-enzyme to 10,000 genes, Applied Mycology And Biotechnology,3: 295-313.

Bucio -Villalobos , C. M. ; Olevra, H. A. L. , Anguiano – Ruvalcaba , G. L. and Guzman-De- Pena, D. A. (2005). Effect of plant growth regulaters on mycotoxigenic*Aspergillus spp*. in vitro, Revista Mexicana de Fitopatologia , 23(1): 68- 73.

Bueno, E. A. ; Oliveira, M. B., Petrofeza, S., Andrade,R. V. and Junior, M. L. (2012). Effect of different carbon sources on proteases secreted by the fungal pathogen *Sclerotiniasclerotiorum*during *Phaseolus Vulgaris* infection, Genet. Mol. Res., 11 (3): 2171-2181.

Bullock, S. and Willetts, H. J. (1996). Ultrastructural and histochemical studies on mycelial germination of sclerotia of *Sclerotinia minor*. Mycol. Res. 100: 561-570.

Butler, M. J. ; Gardiner, R. B. and Day, A. W. (2009). Melanin synthesis by *Sclerotiniasclerotiorum*, Mycologia, 101 : 296 – 304.

Calişkan, M. (2000). The metabolism of oxalic acid, Turk J. Zool, 24 : 103- 106.

Cessna, S. G. ; Low, P. S. , Sears, V. E. and Dickman, M. P.(2000). Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotiniasclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant, The Plant Cell, 12: 2191–2199.

Chang, C. and Huang, H. C. (2003).Effect Of relative humidity on myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia minor*, Plant Pathology Bulletin, 12:65-68.

Chavan SP, Korekan, SL (2007). A Survey of some Medicinal Plants for Fungal Diseases from Osmanabad District of Maharashtra State. Recent Research in Science and Technology., 3(5):15-16.

Clarkson, J. P. ; Phelps, K. ,Whipps, J. M. ,Staveley, J. and Young, C. S. (2004). Ascospore release and survival in *Sclerotiniasclerotiorum*, *Mycol. Res.*107 (2): 213–222 .

Curran, J. ; Driver, F., Ballard, J. W. O. and Milner, R. J. (1994). Phylogeny of metarhizium: analysis of ribosomal dna sequence data. *Mycol. Res*. 98: 547-552.

Davies, D. D. and Asker, H. (1983). Synthesis of oxalic acid by enzymes from lettuce leaves. Plant Physiol. 72, 134-138.

Dernoeden, P. H. and Davis, J. G.(2002). Dollar spot severity, tissue nitrogen, and soil microbial activity in bentgrass as influenced by nitrogen source , Crop Sci., 42:480–488.

Dickman , M. B. and Rollins , J. A. (2001). Increase in endogenous and exogenous cyclic amp levels inhibits sclerotial development in *Sclerotiniasclerotiorum*, Applied And Environmental Microbiology 64: 2539 –2544.

Dickman, M. B. and Rollins, J. A. (2001). PH signaling in *Sclerotiniasclerotiorum*: identification of A *Pacc/RIM1* homolog. Applied And Environmental Microbiology.67(1):75 - 81.

Dillard, H. R. ;Luding, J. W. and Hunter, J. E. (1995). Conditioning sclerotia of *Sclerotiniasclerotiorum* for carpogenic germination, plant disease, 79: 411- 415.

Dłużniewska, J. (2008). The effect of foliar fertilizers on the development and activity of *Trichoderma* spp., *Polish J. of Environ. Stud.* , 17(6): 869-874

Dohroo, N. P. and Cuong, N. D. (2006). Morphological, cultural and physiological studies on *Slerotiniasclerotiorum* causing stalk rot of cauliflower, Omonrice , 14 : 71 – 77 .

Dutton, M. V., and Evans, C. S.(1996). Oxalate production by fungi:Its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. Can.J. Microbiol. 42,881–895

Elad, Y. (1995). Physiological factors involved in susceptibility ofplants to pathogens and possibilities for disease control – the*Botrytis cinerea* example. in: Lyr, H.(ed.). modern fungicidesand antifungal compounds, British Crop ProtectionCouncil, Intercept, UK., 217–233.

Ellis, D. H. (1994). Clinical mycology : the human opportunistic mycosis., Gillingham printers pty. Ltd. Australia: 166 pp.

Erper , I. ; Turkkan , M . , Karaca , H .G . andKilic , G. (2011) . Evaluation of *in vitro* antifungal activity of potassium bicarbonate on *Rhizoctoniasolani* AG 4 HG-I, *Sclerotiniasclerotiorum* and *Trichoderma sp*. *African Journal of Biotechnology*, 10: 8605–8612

Evans, M. L. (1984). Function of hormones at the cellular level of organization. in : Scott, T. K. (ed.). Encyclopedia of Plant Physiology, 10 thedn. Springer Verlag , Berlin.

Fernando, W.G. D. ;Ramarathnam, R. , Savchuka, S. C. , Krishnamoorthy, A. S. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol, Soil Biology and Biochemistry, 37 : 955–964.

Gue, Q. ;Kimiharu, I. and Masao, A. (2004). Overwintering of rice sclerotial disease fungi, *Rhizoctonia* And *Sclerotiumspp*. in paddy fields in japan, Plant Pathology Journal, 3(2) : 81-87.

Hadi , M. R. andBalali, G. R. (2010). The effect of salicylic acid on the reduction of *Rizoctoniasolani*damage in the tubers of marfona potato cultivar, American-Eurasian J. Agric. and Environ. Sci., 7 (4): 492-496.

Hartman, G. L. ; Vuong,T. D. , Hoffman, D. D. , Diers, B. W. , Miller, J. F. and Steadman, J. R. (2004). Evaluation of soybean, dry bean, and sunflower for resistance to *Sclerotiniasclerotiorum* , Crop Sci., 44 :777–783.

Hassan , S. A. and Shahzad , S. (2004) . Effect of sea salt on in vitro growth of *Sclerotiniasclerotiorum*, Pak. J. Bot, 36: 677-682 .

Hastrup, A. C. S. ; Jensen, B. , Clausen, C.and III, F. G. (2006).The effect of $cacl_2$ on growth rate, wood decay and oxalic acid accumulation in *Serpulalacrymans*and related brown- rot fungi, Holzforschung, 60: 339–345.

Hawthorne, B. T. (1975) . Observations on the development of apothecia of *Sclerotinia minor*Jagg. In The Field. N. Z. J. Agric. Res. 19: 383 - 386.

Hilal A. A. ; Nada M. G. A., ZakyWafaa H. (2006). Induced resistance against *sclerotiniasclerotiorum* disease in some umbelliferous medicinal plants as a possible and effective control mean. Egypt. J. Phytopathol., 34: 85-101.

Huang , H. C. and Yeung, J. M. (2002). Biochemical pathway for the formation abnormal sclerotia of *Sclerotiniasclerotiorum* , Plant Pathology Bulletin , 11(1): 1-6.

Humar, M. and Pohleven, F. (2005). Influence of a nitrogen supplement on the growth of wood decayfungi and decay of wood, International Biodeterioration and Biodegradation, 56: 34 – 39.

Jarosz-Wilkolazka, A. and Gadd, G. M. (2003). Oxalate production by wood-rotting fungi growing in toxic metal-amended, Medium Chemosphere, 52 : 541 – 547.

Johal, G. S. and Rahe, J. E. (1984). Effect of soilborne plant-pathogen fungi on the herbicidal action of glyphosate on bean seedling, J. Phytopathology , 74 (8) : 950 - 955.

Júnior, T. J. P. ; Vieira, R. F., Teixeira, H. andCarneiro, J. E. S. (2009). Foliar application of calcium chloride and calcium silicate decreases white mold intensity on dry beans, *Tropical Plant Pathology*, 34 (3): 171-174.

Kim, S. H. ;Jeon, Y., Kwon, H. and Nam, J. (2006). Characterization of *Sclerotiniasclerotiorum* isolated from paprika, Korean Society of Mycology, Mycobiology, 34(3): 154-157 .

Kohn, L. M. (1979). A monographic revision of genus *Sclerotinia*,Mycotaxon, 9: 365-444.

Kora, C. ; McDonald, M. R. and Boland G. J. (2003). Sclerotinia rot of carrot: an example of phenological adaptation and bicyclic development by *Sclerotiniasclerotiorum*. Plant Disease 87(5): 456-470.

Landschoot, P. J. and McNitt, A. S. (1997).Effect of nitrogen fertilizers on suppression of dollar spot disease of *Agrostisstolonifera*L., International Turfgrass Society Research Journal, 8: 905 -911.

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.

Le tourneau D. (1979).Morphology, cytology and physiology of Sclerotinia species in culture. Phytopathology 69 (8): 887-890.

Liew, C. L. and Prange, R. K. (1994). Effect of ozone and storage temperature on postharvest diseases and physiology of carrots

(*Daucuscarota*L.), J. AMER. SOC. HORT. SCI. 119 (3) : 563–567.

Liu, L. x.; Hsiang, T., Cary, C., and Eggens, J. L. (1995). Microbial populations and suppression of dollar spot disease in creeping bentgrass with inorganic and organic amendments, Plant Disease 79, 144-147.

Malvarez, G. ; Carbone, I. , Grünwald, N. J. , Krishnamurthy, V. S. , Schafer, M. and Kohn, L. M. (2007). New populations of *Sclerotiniasclerotiorum* from lettuce in california and peas and lentils in washington, The American Phytopathological Society 97:470-483.

Marciano, P. ;Magro, P., and Di Lenna, P. (1983) . Oxalic acid production and its role in pathogenesis of *Sclerotiniasclerotiorum*.FEMS Microbiol.Lett. 24:9–12.

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 Dis , 89:50-54.

Mauch-Mani, B. and Metraux, J. (1998) Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack *Annals of Botany* 82: 535-540.

McDonald, M. R. , and Boland, G. J. (2003). Sclerotinia rot of carrot: An example of phenological adaptation and bicyclic development by *Sclerotiniasclerotiorum*. Plant Dis. 87: 456 - 470.

Metwally, A. H. ; Mahmoud, E. Y. , Shokry, S. Y. M. and Hussin, Z. N. (2006). Effect of growth regulators in controlling of peanut root rot diseases and compared to fungicides treatment. J. Agric. Sci. Mansoura Univ., 31: 3537- 3548.

Micales, A. J. (1995). *In vitro* oxalic acid production by the brown-rot fungus *Postiaplacenta* ,SonderdruckAus: Material und Organismen 29: 159 -176.

Mila, A. L. and Yang, X. B. (2007). Effects of fluctuating soil temperature and water potential on sclerotia germination and apothecial production of *Sclerotiniasclerotiorum* , Plant Disease, 92 : 78 – 82 .

Mohamed, F. G. (2001) Pathological, histological and biochemical studies on *Sclerotiniasclerotiorum*the causal agent of fruits rot, Egypt J. Phytopathol., 25 (1-2): 17 pp.

Motallebi, M. ;Zamani, M.R. and Azad, H. A. (2008). Polygalacturonase production by *Sclerotiniasclerotiorum*, causal agent of canola stem rot: parameter optimization using taguchiapproach , World Applied Sciences Journal, 3 (1): 96-101.

Munir , E.; Shimada , M. , Yoon, J.J. , Tokimatsu, T. and Hattori, T. (2001). A physiological role for oxalic acid biosynthesis in thewood-rotting basidiomycete*Fomitopsispalustris* , PNAS , 98 (20) : 11126 - 11130.

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 *Sclerotiniasclerotiorum* isolates from new zealand and USA, Environmental Weeds and Pests, 49: 126-131.

Olivier, C. ; Mac-Neil, C. R. and Loria, R. (1999): Application of organic and inorganic salts to field-grown potato tubers can suppress silver scurf during potato storage. Plant Dis. 83: 814 - 818.

Partridge, D. E., Sutton, T. B., Jordan, D. L., Curtis, V. L., and Bailey, J. E. (2006). Management of sclerotinia blight of peanut with the biological control agent *Coniothyriumminitans*. Plant Dis. 90:957-963.

Peltier, A. J. ; Bradley, C. A. , Chilvers, M. I. , Malvick, D. K. , Mueller, D. S. , 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): 7pp.

Peres , Â. P. ; Machado, J. D. C. andNasser, L. C. B. (2002). Use of semi-seletive media for detection of*Sclerotiniasclerotiorum*on bean and soybean seeds ,Fitopatol. bras., 27(2): 123-127.

Punja, Z. K. and Grogan, R. G. (1981). Eruptive germination of sclerotia of *Sclerotiumrolfsii*,PHYTOPATHOLOGY, 71(10) : 1092- 1099.

Purdy, L. H. (1979). *Sclerotiniasclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* , 69 , 875–880.

Ragab, M. M.; Osman, A. R. and Ghada, A. A. E. (1997): Detection of some *Sclerotiniasclerotiorum* isolates With Reference To

Sclerotium Formation And Fatty Acids Content. Egypt J. Phytopathol., 25(1-2): 27-36.

Rahamah, B. M. ;Siti Noor, F. M. D. , Khairulmazmi, A. , Idris, A. , Ahmed, O. H., Zamri, R. and Sariah, M. (2012). *In vitro* effects of salicylic acid, calcium and copper ions on growth and sporulation of *Ganodermaboninense*African Journal of Biotechnology, 11(70) : 13477-13489.

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*Triboliumcastaneum*(red flour beetle), African Journal of Biotechnology, 8 (23): 6710-6715.

Reinhardt, L. A.; Svedruzic, D. , Chang, C. H., Cleland, W. W. and Richards, N. G. J. (2003). Heavy atom isotope effects on the reaction catalyzed by the oxalate decarboxylase from *Bacillus subtilis*.*Journal of the American Chemical Society* 125, 1244–52.

Rincon, A. ;Priha, O. , Sotta, B. , Bonnet, M. and LE , F. (2003). Comparative effects of auxin transport inhibitors on rhizogenesis and mycorrhizal establishment of spruce seedlings inoculated with*Laccaria bicolor*, Tree physiology, 23: 785–791.

Riou, C. ; Freyssinet, G., Fèvre, M. (1991).Production of cell wall degrading enzymes by thephytopathogenic fungus *Sclerotiniasclerotiorum*. Applied and EnvironmentalMicrobiology, 57: 1478–1484.

Ryals, J.A. ;Neuenschwanderm, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H.-Y., Hunt, M.D., (1996). Systemic acquired resistance. Plant Cell 8, 1809–1819.

Safaie, N. ;Karimi, E. and Bakhsh, M. S. (2012). Mycelial compatibility groupings and pathogenic diversity of *Sclerotiniasclerotiorum* (Lib.) De Bary populations on canola in golestan province of iran, *J. Agr. Sci. Tech.* ,14 : 421 -434.

Safaie, N. ;Karimi, E. and Shams-bakhsh, M. (2011). Assessment of genetic diversity among *Sclerotiniasclerotiorum* populations in canola fields by Rep-Pcr, Trakia Journal of Sciences, 9 : 62-68.

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.

Sambrook, J.; Fritschi, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual 3rd (ed.). Cold spring Harbor laboratory press, New York.

Smith, D. L. (2004). Biology and epidemiology of *Sclerotinia minor* on peanut (*Arachishypogaea L.*). M. Sc. Thesis .Univ .North Carolina State.105.

Soltan, H. H. ; Hafez , M. S. , Abdel-Rahman, F. A. , Abdel-Mageed, M. H. and Mohamed , F. G. (2010). Controlling of the grey and white moulds on bean pods under storage conditions, *Egypt J. Phytopathol.,* 27(2): 109-116.

Stevens , R. B. , (1981) . Mycology Guidebook.University of Washington Press, Seattle, Washington.

Tanrikut, S. and Vaughan, E. K. (1951).Studies on the physiology of *Sclerotiniasclerotiorum*.Phytopathology. 41:1099-1103.

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.

Tenuta, M., and Lazarovits, G. (2004). Soil properties associated with the variable effectiveness of meat and bone meal to kill microsclerotia of Verticillium dahlia. Applied Soil Ecology 25:219–236.

Tolba, A. F. and Mohamed, F. G.(2002). Biological and chemical control of *Sclerotiniasclerotiorum*on *Centaureacyanus*plants, *The Eighth Conference Of The Agricultural Development Researches, Fac . Agric. Ain Shams Univ.,*1725-1748.

Tomita, K. ; Murayama,T. and Nakamura, T. (1984): Effects of auxin an gibberellin on elongation of young hyphae in *Neurosporacrassa*. Plant Cell Physiol. 25, 355–358.

Toor, R. F. V. ; Jaspers, M. V. and Stewart, A.(2004). Bicarbonate salts and calcium cyanamide suppress apothecial production by *Ciboriniacamelliae*, *New Zealand Plant Protection*, 57:142-145.

Tudzynski, B. and Holter, K. (1998). Gibberellin biosynthetic pathway in *GibberellaFujikuroi* : evidence for a gene cluster. Fungal Genet.Biol. 25:157-170.

Tuite, J. (1969). *Plant pathological methods*- fungi and bacteria,Burgess Publishing Company Minneapolis, Minnesotta, p. 239.

Vale, F.X.R. ;Zambolim, L. , Paul, P. A. and Costa, H. (2000). Doençascausadasporfungosemtomate.in: (Eds.) Controle de doenças de plantas, Hortaliças. Viçosa MG. SupremaGráfica E Editora. Pp. 699-756.

Vida, J. B. ;Tessmann, D. J. , Filho, J. U. T. B., Caixeta, M. P., Zambolim, L. and Verzignassi, J. R. (2004). Manejo de doenças de plantasemcultivoprotegido ,Fitopatol. bras., 29(4): 355- 372.

Wagner, G. J. (1981). Vacuolar deposition of ascorbate-derived oxalic acid in barley. Plant Physiol. 67, 591-593.

Wang, S. Y. C. and Le tourneau, D. (1971). Carbon sources, growth, sclerotiom formation and carbohydrate composition of *Sclerotiniasclerotiorum,* Arch. Mikrobiol, 80 : 219- 233.

Webster, J. and Weber, R. (2007). Introduction to fungi, Cambridge University Press , UK , 3th Eidition, :875 PP.

Wong , A. L. and Willetts , H. J. (1979). Cytology of *Sclerotiniasclerotiorum* and related species: *Journal of General Microbiology* ,112 : 29

Yalpani, N., Raskin, I., (1993). Salicylic acid: a systemic signal ininduced plant disease resistance. Trends Microbiol. 1, 88–92.

Zhang, S. ;Kloepper, J. W. , Reddy, M. S. and Moyne, A. (2012). The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco, Biological Control, 25 : 288–296.

Summary

Laboratory experiments were conducted in the postgraduate laboratories, Biology Department – College of Educationfor pure science / Kerbala University,

from Dec./2011- Oct.2012. Identification of the strain of *Sclerotiniasclerotiorum* fungus was obtained for first time in Iraq depending on Polymerase Chain Reaction technique (PCR) which positive with MCG strain at 475 bp sequence and in Entrobacterial Repetitive Intergenic (ERIC) region.

The effect of several environmental requirements such as temperature, pH and the type of medium growth were studied .The result showed that temperature 10-20˚C , and pH 3.5-6.5 were favored for growth and sclerotia formation. While the Potato Dextrose Agar media was the best for growth and sclerotia creating for fungus in comparison with the other mediums in this study (Agar Mannitol, CzapeksDox Agar & Nutrient agar).

The ability of some chemicals was tested in resistance of *S.sclerotiorum*, such as plant regulators (gibberellic acid & salicylic acid), and some nutrient elements such as, ammonium sulphate $(NH_4)_2SO_4$, potassium sulphates K_2SO_4 and calcium carbonate $CaCO_3$, where the result showed the rate of growth and sclerotia formation was less under high concentration of ammonium sulphate and potassium sulphate and arrived to 5.75 & 1.8 cm at 10^5 on Respectively, while the fugus didn't givesclerotia at same concentration. on the other hand, the calcium carbonate didn't showed any effect on growth rate , but notes morphological malformation (distortion) on the mycelia at concentrations 10^4&10^5 ppm without sclerotiaformation.

The result showed the ability of Gibberellic Acid to affect fungus, where less growth rate at ، 200 , 250 ppm to 5.25 and3.87 cm respectively with slow formation of sclerotia. While the fungus arrived to least growth rate with Salicylic Acid which was 0.12 , 0.00, 0.25 and 0.00 cm at all of 100, 150 ,200 and 250 ppm concentrations on Respectively. on the other hand, the sclerotia maturation was slowdown at 100 ppm and stopped at other concentrations.

The ability of fungus to produce oxalic acid on the broth media and under same factors that was remembered, where the result showed raised in amount of production of the acid by fungus by increasing the temperature to 25˚C and was arrived to 7.46 mg, and showed reduction with raised the temperature at 30˚& 35ºCand was arrived to0.00mg, while the difference in pH has recorded the highest production at 5.5pH,Whileno significant difference appears when both 7.5 & 9.5. The result showed a significant deference in amount of produced acid by fungus under effect of salts factors that were studied (K_2SO_4 , $(NH_4)_2SO_4$& $CaCO_3$), where noted

fewer in oxalic acid production under ammonium sulphate effect giving 2.95 mg at 10^4ppm , then potassium sulphategiving 4.55 mg at the same concentration. Mean while, the funguswas not able to produce the oxalic acid under effect of all calcium carbonate concentration that was used in this study. The gibberellic acid & salicylic acid affected acid production where arrived to 1.13 mg at 150 ppm with gibberellic acid and 2.3 mg at 200 ppm with salicylic acid.

Ministry of Higher Education & Scientific Research

University of Kerbala/ College of Education

for Pure Science- Department of Biology

Studyof Environmental and Chemical Effects on Growth and Sclerotia Production of *SclerotiniaSclerotiorum*

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

In

Biology – (Botany)

by

Haider Abdul MoneemAlmothafer
(B. Sc. Karbala University / 2009)

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

2013