عزل وتشخيص بعض الفطريات المسببة لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء ومقاومتها ببعض المستخلصات النباتية والفطر الاحيائي *Trichoderma viride*

عهد عبد علي هادي مطلوب محمد احمد عمران كيف الكيف
جامعة الفرات الاوسط التقنية/ الكلية التقنية المسيب

المستخلص

بينت نتائج المسح الحقلي الذي اجري في 15 حقلاً مزروعة بنبات الباقلاء تابعة لمحافظة بابل انتشار مرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء في جميع المناطق التي شملها المسح وبنسب اصابة تراوحت بين 40-100% وبشدة اصابة تراوحت بين 26.7-75% وبينت نتائج العزل والتشخيص تباين في وجود الفطريات وكانت الفطريات *Rhizoctonia solani* و *Fusarium solani* و *Macrophomina phaseolina* اكثرها ظهورا . اثبتت نتائج التشخيص الجزيئي لهذه الفطريات ان 12 عزلة من الفطر *R . solani* تابعة له و 9 عزلات من الفطر *M. phaseolina* تابعة لهذا الفطر ما عدا الفطر *F. solani* فقد تبين من خلال هذا الاختبار عدم حصول تفاعل البرايمر الخاص به مع عزلتين تابعة له باستخدام تقنية Polymerase Chain Reaction PCR . بينت نتائج الاختبار للمقدرة الامراضية للفطريات المدروسة تفاوت في نسب الانبات وتغاير في شدة الاصابة. واظهرت نتائج الكشف الكيميائي للمستخلصات النباتية (اللزيج، الالبيزيا، عرف الديك) احتوائها على مركبات فعالة قادرة على تثبيط الفطريات الممرضة، واظهر مستخلص نبات اللزيج تفوقه في نسبة التثبيط للفطريات المدروسة اذ بلغ معدل تثبيط الفطريات *R . solani* و *F. solani* و *M. phaseolina* 100، 91.47، 88.17 % على التوالي بتركيز 15% ايضاً .اظهر الفطر *T. viride* قدرته التثبيطية العالية على الفطريات المدروسة.

الكلمات المفتاحية: الباقلاء، تعفن الجذور، الفطريات، البكتريا، معايير النمو

Isolation and identification of some Fungi caused Broad bean root and crown root disease by some plant extracts and Bioagents *Trichoderma viride* in

Ahed A H Matloob Mohamed A I K Alkaif
Al furat Al Alawsat tech. Uni. Al Musaib Tech. College

Abstract

A field survey was conducted in 15 Broad bean plant fields in Babylon province/Iraq in growth season 2014 this survey was to evalnate the incidence and severity of root and crown rot disease on Broad bean crop. The results showed that the disease was faund in all studied fields with varions incidence (between 40 to 100%) and severity between (26.7 to 75%). Additionally,the The results of isolation and indentification of the disease pathogens domenstreted a Variation in presence of different causal agents. For example,the pathogens *Rhizoctonia solani* , *Fusarium*

solani and *Macrophomina phaseolina* wer the most existion in whole tested fields. Also, the molecular diagnosis of these three fungal pathogens using Polymerase Chain Reaction test showed that 12 isolates were belonging to *R. solani* and 9 isolates to *M. phaseolina*. However, tow isolatesof *F. solani* were not detected while 10 isolates were detected clearly. The pathogensity test of these three fungi showed a variation in germination prcentage of tested seeds and differentiontion in disease severity.As well as, the chemicals detection test of three different plant extracts (Cocklebur, Albizzia, Redrot pigwed) indicated to exiting active compounds that were capable in inhibiting the three pathogens growth. The extract of Cocklebur plant was the most effective one by inhibiting percentage *F. solani* (100%), *R. solani* (91.47%)and *M. phaseolina* (88.17%).furthermore, the bioagent *Trichoderma viride* showed high efficiency in inhibition of the three cusal agents .

Key words: Broad bean, root rot, fungi, bacteria, growth standards

المقدمة

يعود نبات الباقلاء *Vicia faba* L. إلى العائلة البقولية Leguminaceae ويعد من النباتات الاقتصادية المهمة في العديد من بلدان العالم وتأتي بالمرتبة الثانية بعد العائلة النجيلية من حيث الأهمية الاقتصادية وتعد بلاد الجزائر الموطن الأصلي لها (28,26) يزرع نبات الباقلاء في اغلب المناطق الزراعية في العراق إذ بلغت المساحة المزروعة فيها لعام 2012 حوالي 58600 دونماً وكمية الانتاج 114600 طن (6)

تصاب الباقلاء بالعديد من الأمراض الفطرية وأهمها مرض تعفن الجذور وقواعد السيقان والذي يعد من الأمراض ذات التأثير الكبير على محصول الباقلاء في العديد من مناطق العالم (34,9) ففي السنوات الاخيرة لوحظ انخفاض في معدلات الانتاج في محصول الباقلاء في العراق اذ بلغ الانتاج في سنة 2000 حسب ما اشارة اليه المركز الاحصائي السنوي 221,524 طن اما في سنة 2011 بلغ الانتاج 154,400 طن بينما في عام 2012 فبلغ الانتاج 114,600 طن وان هذا الانخفاض في الانتاج قد يعود الى اسباب كثيرة منها الاصابة بالعديد من المسببات المرضية للنبات التي تتواجد في التربة وأهمها الفطر *Rhizoctonia solani* ، spp. *Fusarium* و *Macrophomina phaseolina* و *Pythium* spp., إذ تقوم هذه الفطريات بمهاجمة البذور والبادرات وجذور هذا المحصول مسببة تعفنها مما يؤدي إلى حدوث خسائر كبيرة في الإنتاج (57). استخدمت طرائق عدة لمكافحة مرض تعفن جذور وقواعد سيقان نبات الباقلاء منها استخدام المكافحة الكيميائية (8). لكن وجد أن للمبيدات الكيميائية بعض التأثيرات السلبية على البيئة وصحة الإنسان والاحياء غير المستهدفة نتيجة للاستعمال المكثف والخاطئ (50,36) لذلك بداء التفكير في البدائل التي من أبرزها استعمال الكائنات الحية الدقيقة في برامج المكافحة الإحيائية لخفض لقاح المسببات المرضية وزيادة الإنتاج مثل استعمال الفطر *Trichoderma viride* لما يمتلكه من خصائص تضادية متنوعة تجاه المسببات المرضية وأهميته في تحسين نمو

النبات وإنتاجه، فضلاً عن ما يتميز به من سهولة العزل والإكثار وإمكانية استعماله في مدى واسع من الظروف المختلفة وتنميته وتحميله على العديد من الأوساط الغذائية رخيصة الثمن (55,40,39) كما كان لاستخدام المستخلصات النباتية فعالية في خفض لقاح المسببات الممرضه واختزال شدة المرض لعدد من مسببات امراض التربة الفطرية مثل *Fusarium oxysporum*، *Fusarium solani*، *Rhizoctonia solani* *Phytophthora cinnumoni*،*Fusarium moniliforme*، (27) حيث عند تحلل الاجزاء النباتية المضافة للتربة تطلق مركبات تؤدي الى تثبيط الممرضات النباتية وتزيد من فعالية الاحياء المجهرية ذات القدرة التثبيطية لهذه الممرضات مما يزيد من فعاليةعملية المكافحة وبصورة تازرية مع عامل المكافحة الاحيائية (51).

ولأهمية مرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء صممت هذه الدراسة بهدف:-

1- تحديد مدى انتشار مرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء في محافظة بابل / العراق

2- محاولة مكافحة مسببات هذا المرض باستعمال بعض المستخلصات النباتية والفطر الاحيائي *Trichoderma viride*.

المواد وطرائق العمل

مسح مرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء في بعض مناطق محافظة بابل

تم أجراء مسح لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء خلال للفترة من 2014/2/25 ولغاية 2014/3/18 اذ انتخب 15 حقل، تراوحت مساحتها 1-7.5 دونم في محافظة بابل، (جدول 1) ، اخذت العينات بصورة عشوائية وذلك بقلع النباتات باحتراس ووضعها في أكياس بولي اثلين مع تسجيل بعض الملاحظات منها مكان وتاريخ جمع العينة ونوع الزراعة والمساحة وموعد الزراعة وغيرها، ثم تم حساب النسبة المئوية للإصابة وحسب المعادلة التالية:

%الاصابة= عدد النباتات المصابة / عدد الكلي x 100

و حساب شدة الاصابة وفق الدليل المرضي الموصى به للجذور وحسب معادلة Mckinney (43) وكما يأتي:

0= جذور سليمة.1 = تلون(تعفن) الجذور الثانوية .2= تلون الجذور الثانوية وجزء من الجذر الرئيسي. 3= تلون الجذر الرئيسي دون تلون قاعدة الساق. 4= تلون الجذر الرئيسي وتهرؤه وتلون قاعدة الساق. 5= موت النبات.

% لشدة الإصابة=(عدد النباتات في الدرجة 0 ×0)+(عدد النباتات في الدرجة 1×1) + ... +(عدد النباتات في الدرجة 5×5)/ مجموع النباتات المفحوصة × 5× 100

جدول (1) مسح مرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء في بعض مناطق محافظة بابل

رقم العينة	الموقع	المساحة الحقل/دونم	التاريخ	رقم العينة	الموقع	المساحة الحقل/دونم	التاريخ
1	محرم	7.5	2014/2/25	9	المهناوية	3.5	2014/3/6
2	قرية الامام المنتظر	4	2014/2/25	10	ابي غرق	1	2014/3/6
3	الامام/الصباغية	5.5	2014/2/26	11	القاسم/الدروع	6	2014/3/6
4	البدعة	3	2014/2/26	12	الهاشمية	2	2014/3/6
5	النيل	2	2014/2/28	13	المدحتية	3	2014/3/6
6	الطاهرية	2.5	2014/3/1	14	العزاوية	2	2014/3/9
7	الوطيفية	1.5	2014/3/2	15	مويلحة	1	2014/3/18
8	جبلة	3	2014/3/3				

عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لجذور وقواعد سيقان الباقلاء :-

جلبت النباتات التي ظهرت عليها أعراض الإصابة (صورة 1) إلى المختبر، اخذ أجزاء من الجذور وقواعد السيقان التي ظهرت عليها أعراض التعفن والتقرحات ، غسلت وعقمت سطحياً بمحلول هايبوكلورات الصوديوم (0.5% كلور حر) وحسب الطرق الموصى بها ونشفت بورق الترشيح المعقم ونقلت بواسطة ملقط معقم وزرعت بواقع 4 قطع نباتية في كل طبق بتري قطر 9 سم حاوي على الوسط الزرعي (PDA) Potato Dextrose Agar المضاف إلية المضاد الحيوي Tetracycline بتركيز 200 ملغم / لتر وذلك بعد تعقيم الوسط بجهاز المؤصدة (121 م° وضغط 1.5كغم/سم^2) لمدة 15 دقيقة حضنت الأطباق في درجة حرارة 25±1 م° لمدة 3 أيام،

صورة 1. أعراض الإصابة بمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء

أ- الأعراض على الجذور وقاعدة الساق ب-اعراض على الجذر الرئيسي والثانوية

التشخيص الجزيئي:

لكون الفحص المظهري والمجهرية بات لا يعتمد في الكثير من دول العالم لانها تستهلك وقت اكبر وخاضع للتحيز ومعرضة للاخطاء، بالإضافة إلى تشابه الفطريات في الصفات المظهرية على الأوساط الزرعية مع صعوبة تشخيصها مجهريا والتي قد لا تعطي ادلة كافية وقاطعة للتفريق بين انواع الاجناس الفطرية *R . solani* و *F. solani*. و *M. phaseolina* ، ولأهمية التشخيص اذ ينبغي تحديد الجنس والنوع باستعمال طرق معتمدة مثل التشخيص الجزيئي الذي يكون ذا حساسية وتخصصية عاليتين وفقا لتعليمات منظمتي الغذاء والزراعة Food and Agriculture Organization (FAO) والصحة العالمية World Health Organization (WHO) (45)اجري التشخيص الجزيئي لتأكيد تشخيص العزلات.

تم تنفيذ هذه الدراسة في مختبر الأبحاث الجزيئية/ شعبة الأغذية المحورة جينيا/ قسم البايلوجي الجزيئي/ مركز تلوث الغذاء/ دائرة بحوث البيئة والمياه التابع لوزارة العلوم والتكنولوجيا/ بغداد/ العراق.

- **البادئ الخاص المستخدم في عملية تشخيص الفطريات**

جدول (2) بعض الصفات الخاصة بالبادئات التي تم استخدامها للكشف عن الفطريات

اسم الفطر	اسم البادئ	تسلسل النيوكليوتيدات من5′ الى 3′	حجم الحزمة التي تنتجه (bp)	اسم الجين
R. solani	ITS1F	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'	700	S 5.8 Rrna
	ITS4R	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'		
F. solani	TEF-F.s4F	5-ATCGGCCACGTCGACTCT-3	658	TEF-1α
	TEF-F.s4R	5-GGCGTCTGTTGATTGTTAGC-3		
M. phaseolina	MpKF	5-CCGCCAGAGGACTATCAAAC-3	350	MPK
	MpKR	5-CGTCCGAAGCGAGGTGTATT-3		

- **طرائق العمل الخاصة بتقنية الـ PCR**

أولاً: إستخلاص الحامض النووي DNA وتنقيته

تم استخدام 12عزلة من الفطر *Rhizoctonia solani* و 12عزلة من *Fusarium solani* و 9 عزلة من *Macrophomina phaseolina* والتي سبق عزلها من جذور وقواعد سيقان الباقلاء المصابة من محافظة بابل اذ استخدم الطقم الخاص بالاستخلاص من شركة Geneaid الصينية (Reagent Genomic DNA Kit) نميت هذة العزلات على الوسط الزرعي Potato Dextrose Broth لمدة 7 ايام وحضنت على درجة حرارة25±1 م° رشح الغزل الفطري بواسطة ورق الترشيح للتخلص من الوسط المغذي، وضع الغزل الفطري المرشح داخل الهود تحت درجة حرارة 45م° لغرض تجفيف العينة والتخلص من الرطوبة الزائدة وللحصول على كثافة كبيرة من الغزل الفطري. وضعت كمية من الغزل الفطري في هاون خزفي ثم طحن بوجود النتروجين السائل ، نقلت كمية منه الى أنبوب ابندروف (Eppendroffe tube) حاوية على 293 مايكروليتر من محلول EDTA ثم سُحق بواسطة عيدان خشبية .أضيف 7.5 مايكروليتر من 20 ملغم/مل انزيم Lyticase مع التحريك بلطف أربع مرات لغرض المزج.حُضنت العينات بدرجة حرارة 37 °م لمدة 30–60 دقيقة لكي يقوم الأنزيم بتحطيم الجدار الخلوي، ثم بُردت الى درجة حرارة الغرفة.نُبذت مركزياً بسرعة 13000–16000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين وأزيل الرائق (Supernatant) .اضيف 300 مايكروليتر من محلول التحلل Cell Lysis Buffer الى كل أنبوبة ابندروف الحاوية على الراسب الفطري وحركت بلطف لغرض المزج.حضنت لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 60°م مع التقليب المستمر كل 3 دقائق.اضيف 5 مايكروليتر من انزيم تحطيم ال

RNase ثم حضنت لمدة 5 دقائق.اضيف 100 مايكروليتر من محلول ترسيب البروتينات Protein Removal Buffer، مُزجت الأنابيب جيداً بواسطة المازج الكهربائي Vortex mix لمدة 10 ثانية.تُركت العينات على الثلج لمدة خمس دقائق.نبذت مركزياً بسرعة 14000–16000 دورة/دقيقة لمدة ثلاث دقائق.نُقل الرائق الحاوي على الـDNA المستخلص بواسطة ماصة دقيقة الى أنابيب ابندروف نظيفة ومعقمة حاوية على 300 مايكروليتر من الأيزوبروبانول بدرجة حرارة الغرفة.حُركت الأنابيب بلطف عدة مرات لحين ظهور الـDNA بشكل تركيب يشبه الخيط.نُبذت مركزياً بسرعة 14000–16000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين.أزيل الرائق برفق وقُلبت الأنابيب على ورقة نشاف معقمة. اضيف 300 مايكروليتر بدرجة حرارة الغرفة من 70% إيثانول وقُلبت الأنابيب بلطف عدة مرات لغسل الـDNA المترسب.نُبذت مركزياً بسرعة 14000–16000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين، ثم أزيل الإيثانول برفق.قُلبت الأنابيب على ورقة نشاف معقمة لمدة 10–15 دقيقة لغرض تجفيف الراسب.أضيف 50–100 مايكروليتر من محلول(TEB) Tris–Borate EDTA buffer وحضن على درجة حرارة 60 م° لمدة 30–60 دقيقة.إذا لم يُنجز التضخيم في نفس يوم الاستخلاص تُحفظ النماذج جاهزة بدرجة حرارة 2–8 م°.

ثانياً: الكشف عن الحامض النووي منقوص الأوكسجين (DNA)

استخدمت طريقة الترحيل الكهربائي Electrophoresis بإستعمال هلام الأكاروز بتركيز 1% للكشف عن الحامض النووي منقوص الأوكسجين وكانت المحاليل المتطلبة هي:Agarose وTBE buffer و Bromophenol blue و Ethidium bromide و الكولسترول. تم الكشف عن الحامض النووي منقوص الأوكسجين حسب طريقة Sambrook واخرون(48). وتم حساب نقاوة وتركيز الحامض النووي المنقوص الأوكسجين بواسطة جهاز Spectrophotometer .

ثالثاً: طريقة عمل تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

استخدمت تقنية الـPCR لتضخيم مناطق التفاعل باستخدام البادئ المذكور في الجدول (2). أجريت طريقة العمل بحجم 20 مايكروليتر وكما موضح في الجدول (3) اعتماداً على النشرة المرفقة في Master Mix المصنع من شركة Bioneer بأنبوبة الـ PCR.

جدول (3) أحجام المواد الكيمياوية المستخدمة في التفاعل.

المواد الكيميائية	الحجم
Master Mix	5 µl
Primer Forward	2.5 µl
Primer Reverse	2.5 µl
DNA	5 µl
Nuclease – Free Water	أكمل الحجم إلى 20
Total	20 µl

بعد إتمام الإضافات جميعها مُزجت العينات مركزياً بوساطة جهاز الطرد المركزي الخاص بأنابيب PCR ونقلت العينات إلى جهاز المبلمر الحراري الحلقي PCR thermal cycler اجري تفاعل تضخيم السلاسل لدنا العزلات *Rhizoctonia solani* اعتمادا على البرنامج الموصوف من قبل Stojsinواخرون(53) وكما يلي

رقم الخطوة	الخطوات	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
1	Initial Denaturaion	95مْ	2 min	1
2	Denaturation	94 مْ	30 Sec.	35
3	Annealing	55 مْ	1 min	
4	Extension	72 مْ	1 min	
5	Final extension	72 مْ	10 min	1

واجري تفاعل تضخيم السلاسل لدنا العزلات *F. solani* اعتمادا على البرنامج الموصوف من قبل Arif واخرون (18) .

رقم الخطوة	الخطوات	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
1	Initial Denaturaion	94مْ	2 min	1
2	Denaturation	94 مْ	1 min	40
3	Annealing	58 مْ	1 min	
4	Extension	72 مْ	2 min	
5	Final extension	72 مْ	10 min	1

واجري تفاعل تضخيم السلاسل لدنا العزلات *Macrophomina phaseolina* اعتمادا على البرنامج الموصوف من قبل Babu واخرون (19).

رقم الخطوة	الخطوات	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
1	Initial Denaturaion	95مْ	2 min	1
2	Denaturation	95 مْ	30 Sec.	25
3	Annealing	56 مْ	1 min	
4	Extension	72 مْ	2 min	
5	Final extension	72 مْ	10 min	1

رابعاً: طريقة عمل الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية الPCR

أستخدمت نفس طريقة الترحيل المذكورة اعلاه في الفقرة ثانياً للكشف عن عملية تضخيم الDNA ماعدا استخدام هلام الأكاروز بتركيز 1.5% بدلاً من 1%.

اختبار المقدرة الأمراضية لبعض الفطريات المعزولة

تم اختبار القدرة الامراضية لعزلات الفطريات الأكثر تكرارا والتي شملت (12عزلة من الفطر *F. solani* و12 عزلة من الفطر *R. solani* و9 عزلات من *M. phaseolina*) والتي تم الحصول عليها مسبقاً من خلال

معرفة تاثيرها في انبات بذور الفجل على الوسط الزرعي الاكر والماء Water Agar (20 غم اكر ، 1 لتر ماء مقطر) وذلك حسب طريقة Bolkan و Butler (21) بعد ذلك تم كشف القدرة الامراضية على انبات بذور الباقلاء وحساب شدة الاصابة للبادرات النابتة وفق الدليل المرضي الموصى به للجذور .

تحضير المستخلص المائي لاوراق نبات اللزيج (الحسك) والالبيزيا وعرف الديك وتاثيرها في تثبيط الفطريات المسببة للمرض على الوسط الزرعي PDA

اتُبعت طريقة Seema واخرون (49) مع بعض التحويرات في تحضير المستخلصات المائية وذلك بمزج 150 غم من المسحوق النباتي لكل من (اللزيج ، الالبيزيا ، عرف الديك) مع 1000 مل من الماء المقطر كلا على حدة في دورق حجمي بسعة 2000 مل، ترك المزيج في حمام مائي هزاز بدرجة حرارة 30 مْ لمدة نصف ساعة ثم رشح العالق بواسطة جهاز التفريغ الهوائي (Vacuum pump)، ثم رُشح المزيج باستخدام طبقات عدة من الشاش الطبي ثم عقم بالبسترة عند درجة حرارة 64 م° ولمدة 15 دقيقة (2) وقد حُفظ السائل في أوعية محكمة الغلق في الثلاجة لحين الاستعمال (37).تم اتباع طريقة khanzada واخرون (37) والقريشي(5) وذلك بمزج المستخلص المائي للنباتات المنتخبة مع الوسط الغذائي PDA الذائب بعد أن عُقم وبُرد لدرجة حرارة 45°م اخذ (5 ، 10 ، 15 مل) من المستخلص واضيف الى 95 ، 90، 85 مل على التوالي من الوسط الغذائي PDA . بينما أضيف الى معاملة المقارنة ماء مقطر فقط وبمعدل ثلاثة مكررات لكل تركيز وبعد تصلب الوسط الغذائي لقحت الاطباق في مركزها بقرص قطر (0.5 سم) من مستعمرة فطرية نامية على وسطPDA وبعمر 7 ايام في مركز الطبق الحاوي على أحد التراكيز سابقة الذكر وحضنت الاطباق عند درجة حرارة 25+2مْ نفذت التجربة باستخدام التصميم العشوائي الكامل، وبعد وصول قطر المزرعة الفطرية لمعاملة المقارنة (بدون المستخلص) الى حافة الطبق اخذت النتائج بحساب معدل قطرين متعامدين من نمو كل مستعمرة وتم قياس معدل النمو الفطري وحساب النسبة المئوية للتثبيط وكما في المعادلة

% للتثبيط= (1−(النمو الفطري في المعاملة /النمو الفطري في المقارنة))×100

Montealegre، وآخرون (44).

الكشوفات الكيميائية لبعض المركبات الفعالة في المستخلصات النباتية

تم التحري عن بعض المركبات الفعالة في المستخلصات النباتية المستخلصة وكما يأتي :

الكشف عن الصابونيات Saponins

تم تحضير محلول مائي وذلك بمزج 1 غم من مسحوق النباتات المختارة مع 5 مل من الماء المقطر ثم وضع في انبوبة اختبار ورج بشدة لمدة 5 دقائق وعند تكون رغوة كثيفة تبقى لمدة طويلة يمكن الاستدلال على وجود الصابونيات (52).

الكشف عن الراتنجات Resins

اخذ 10 مل من كل من المستخلصات السابقة التحضير وأضيف إليها 20 مل ماء مقطر المضاف له حامض الهيدروكلوريك 40 %، وان ظهور العكورة Turbidity دليل على وجود الراتنجات (4).

الكشف عن الفلافونيد والفلافونول Flavanoides

مزج 1 مل من المستخلص المائي مع 1 مل من حامض الكبريتيك المركز فكان ظهور اللون الاصفر الداكن دليلاً على النتيجة الموجبة للكشف (17).

الكشف عن التانينات (العفصيات) Tannins

حضر محلول مائي مكون من 1 غم من المسحوق النباتي لكل نبات وأضيف الى 5 مل من الماء المقطر ثم غلي المحلول وبعد أن برّد اضيف اليه محلول كلوريد الحديديك 1% ،اذ يدل ظهور اللون الاخضر المزرق او الاخضر على وجود المواد العفصية (56,16).

كشف عن الفينولات

تم مزج كمية من كلوريد الحديديك المائي 1% مع 5 مل من المستخلص المائي للنباتات المختارة وكان ظهور اللون الازرق دليل على وجود المركبات الفينولية (30)

الكشف عن القلويدات Alkaloids

غُلي المحلول المائي المكون من 10 غم من مسحوق النبات مع 50 مل من الماء المقطر الذي يحتوي على حامضHCL بتركيز 4% ثم رشح المحلول وترك ليبرد ويوضع 1 مل من الراشح في انبوبة اختبار مع احد الكواشف الأتية (31):

أ. كاشف واكنر Wagner reagent

حضر باذابة 2 غم من يوديد البوتاسيوم مع 1.3غم من اليود في 100 مل من الماء المقطر فأذا ظهر راسب بني فأن ذلك يدل على ان النتيجة موجبة للكشف.

ب . كاشف دراجندروف reagent Dragendrof

حضر بمزج 6 غم من يوديد البوتاسيوم مع 10 مل من الماء المقطر ثم أضيف لهما 7 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز و15 مل من الماء المقطر ثم خفف المحلول باضافة 400 مل من الماء المقطر.

ج . كاشف ماير Mayer reagent

تم تحضير محلولين في المحلول (1) اذ تم اذابة 1.36غم من كلوريد الزئبق في 60 مل من الماء المقطر وفي المحلول (2) اضيف 5 غم من يوديد البوتاسيوم في 10 مل من الماء المقطر ثم مزج المحلولان جيداً واكمل الحجم الى 100 مل من الماء المقطر (31). ويتم استبيان النتائج بعد اضافة كل كاشف مع راشح

النبات على وجود القلويدات :كاشف دراجندروف : ظهور راسب برتقالي؛ كاشف واكنر : ظهور راسب بني.كاشف ماير : ظهور راسب بني او ظهور عكورة.

اختبار المقدرة التضادية للفطر *Trichoderma viride* ضد عـزلات الفطريات المسببة لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء على الوسط الزرعي PDA

تم اختبار المـقدرة التضادية لعزلة الفطر *T.viride* (Tv) (التي تم الحصول عليها من أ.د. كامل سلمان جبر كلية الزراعة/ جامعة بغداد) ضد عزلات الفطريات الممرضة *R .solani* و *F.solani* و *M.phaseolina* بطريقة الزرع المزدوج وحسب مقياس Bell واخرون (20) المكون من خمس درجات، (1) العامل الإحيائي يغطي الطبق بالكامل دون السماح للفطر الممرض بالنمو،(2) العامل الإحيائي يغطي ثلثي مساحة الطبق ويغطي الفطر الممرض الثلث الباقي،(3)العامل الإحيائي يغطي نصف مساحة الطبق والفطر الممرض يغطي النصف الأخر، (4)العامل الإحيائي يغطي ثلث مساحة الطبق بينما يغطي الفطر الممرض الثلثين المتبقيين، (5)يغطي الفطر الممرض الطبق دون السماح للعامل الإحيائي بالنمو، ويعد العامل الإحيائي فعالاً من الناحية التضادية عند درجة تضاد 1 أو 2 مع الفطر الممرض.

النتائج والمناقشة

المسح الحقلي لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء

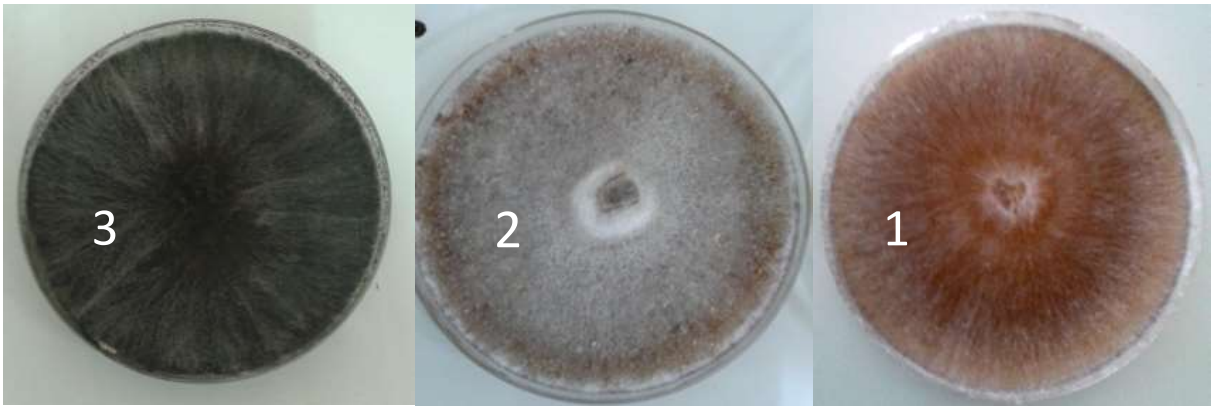
أظهرت نتائج المسح (جدول 4) الذي اجري في حقول زراعة نبات الباقلاء وجود وانتشار مرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء في جميع المناطق التي شملها المسح وبنسب إصابة متباينة تراوحت بين 40-100% وشدة إصابة من 26.7-75% وكانت اعلى نسبة شدة اصابة في مناطق جبلة، الطاهرية، المهناوية،مويلحة، قرية الامام المنتظر وناحية الإمام/الصباغية على التوالي. وقد يعود سبب ارتفاع نسبة وشدة الإصابة في هذه المناطق الى إنها مناطق متخصصة في زراعة الباقلاء إذ يزرع فيها هذا المحصول سنوياً وايضا رداءة بناء التربة التي تجهد جذور النباتات وتجعلها حساسة لمسببات المرضية، استخدام الاصناف الحساسة وبشكل مستمر سنوياً لعدم وجود الاصناف المقاومة وكذلك لائمة الظروف البيئية لتطور المرض اضافة الى ذلك عدم وجود طريقة فعالة في التخلص من المسببات المرضية المستوطنة في التربة الزراعية (25). ولا تتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليها (1) حيث وجدت ان نسبة وشدة الاصابة كانت اعلى وقد يعزى سبب هذا الاختلاف الى التباين في مواقع الحقول التي شملها المسح واختلاف العوامل البيئية نتيجة لاختلاف موعد اجراء المسح .

جدول (4) نسبة وشدة الاصابة بمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء التي شملها المسح لبعض حقول محافظة بابل للموسم الزراعي2013-2014

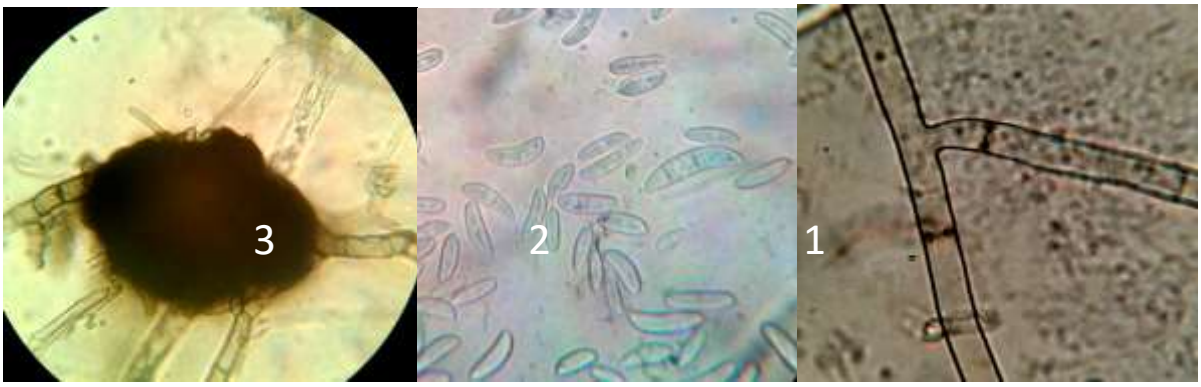
رقم العينة	الموقع	نسبة الاصابة%	شدة الاصابة%	رقم العينة	الموقع	نسبة الاصابة%	شدة الاصابة%
1	محرم	40	26.7	9	المهناوية	100	62.8
2	قرية الامام المنتظر	100	52	10	ابي غرق	54	35.3
3	الامام/الصباغية	100	50	11	القاسم/الدروع	73	40
4	البدعة	75	37.5	12	الهاشمية	80	43.3
5	النيل	60	46	13	المدحتية	60	30
6	الطاهرية	100	73	14	العزاوية	61	36.6
7	الوطيفية	83	50	15	مويلحة	100	52.5
8	جبلة	100	75				

عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لجذور وقواعد سيقان الباقلاء :-

تم عزل وتشخيص أجناس عده من الفطريات من جذور نباتات الباقلاء المصابة بمرض تعفن الجذور وقواعد السيقان وقد كانت الفطريات *R . solani* و *F. solani*. و*M. phaseolina* هي الاكثر تكراراً في الظهور باغلب المناطق وقد سجلت وجودا في معظم العينات، وان هذه النتائج تتفق مع ما ذكره كل من الجبوري (1) وAbo-shady واخرون(15) والمسعودي (7) من ان الفطريات *R . solani* و *F. solani*. و*M. phaseolina* تعد من اهم المسببات المرضية لتعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء.



صورة 2. الفطريات الاكثر تكرارا المعزولة من جذور نباتات الباقلاء 1- *R . solani* و 2- *F. solani* و3- *M. phaseolina* .



صورة 3. الصفات المجهرية التشخيصة لبعض الفطريات المسببة لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء
1- الصفات التشخيصية للفطر *R.solani* التي تبين زاوية التفرع والتخصر عند منطقة التفرع والحاجز القريب منها،
2- الابواغ الكونيدية الكبيرة والصغيرة للفطر *F. solani*، 3- الجسم الحجري للفطر *M. phaseolina* (X40).

التشخيص الجزيئي Molecular Identification

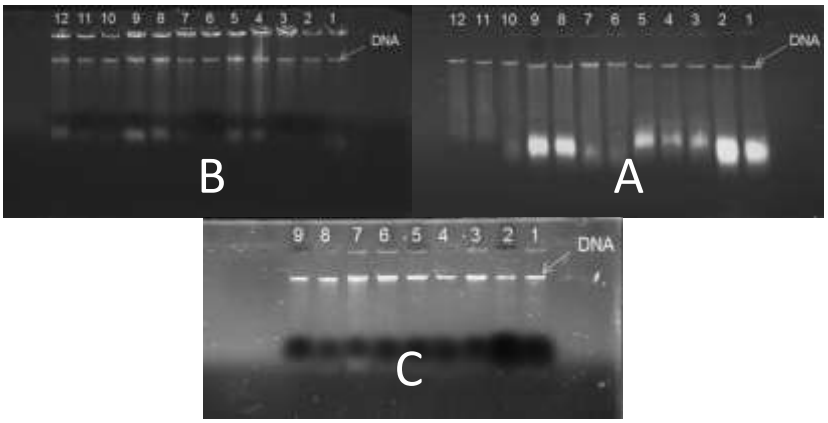
عزل الحامض النووي DNA:

عزل **DNA** من عزلات الفطريات المدروسة، ويظهر الجدول (5) تركيز ونقاوة الدنا المستخلص، إذ بلغ التركيز 7.5 – 9.8 نانوكرام /مايكروليتر وتراوحت نقاوته ما بين 1.51 – 1.91. ومن قيم التركيز والنقاوة في الجدول(5) والصورة (4) يتبين ان الدنا المستخلص من العزلات كان بنقاوة كافية لأجراء تفاعل تضخيم السلسلة إذ ان عملية تضخيم السلسلة (PCR) لا تتطلب كمية كبيرة من الدنا، فضلا عن ان الكمية العالية من الدنا قد تزيد من تكوين نواتج تضخيم غير محددة بينما الكمية القلية للدنا تقلل دقة التضخيم (Green و Sambrook,2012).

الجدول (5) قيم التركيز والنقاوة في DNA المستخلص من الفطريات الممرضة

ت	رمز العزلة	تركيز DNA نانوكرام/ مايكروليتر	نقاوة DNA	ت	رمز العزلة	تركيز DNA نانوكرام /مايكروليتر	نقاوة DNA
1	RS-1	9.8	1.55	6	FS-6	8.3	1.89
2	RS-2	9.3	1.76	7	FS-7	8.1	1.58
3	RS-4	8.8	1.78	8	FS-9	8.3	1.76
4	RS-5	8.7	1.87	9	FS-10	8.6	1.59
5	RS-6	9.1	1.82	10	FS-12	7.5	1.77
6	RS-7	9.3	1.65	11	FS-13	8.2	1.73
7	RS-8	8.9	1.52	12	FS-14	7.8	1.88
8	RS-10	9.0	1.77	1	MP-1	8.4	1.79
9	RS-12	9.3	1.84	2	MP-2	7.9	1,54
10	RS-13	8.8	1.63	3	MP-3	9.1	1.90
11	RS-14	8.2	1.56	4	MP-6	8.4	1.67
12	RS-15	9.4	1.65	5	MP-7	9.5	1.82
1	FS-1	7.9	1.80	6	MP-8	9.6	1.63
2	FS-2	8.1	1.67	7	MP-9	9.2	1.91
3	FS-3	7.7	1.56	8	MP-13	8.8	1.51
4	FS-4	7.9	1.55	9	MP-15	8.6	1.66
5	FS-5	8.5	1.81	6	FS-6	8.3	1.89

***كل رقم يمثل معدل لمكررين**



صورة (4)الترحيل الكهربائي لدنا عزلات على هلام الأكاروز1%

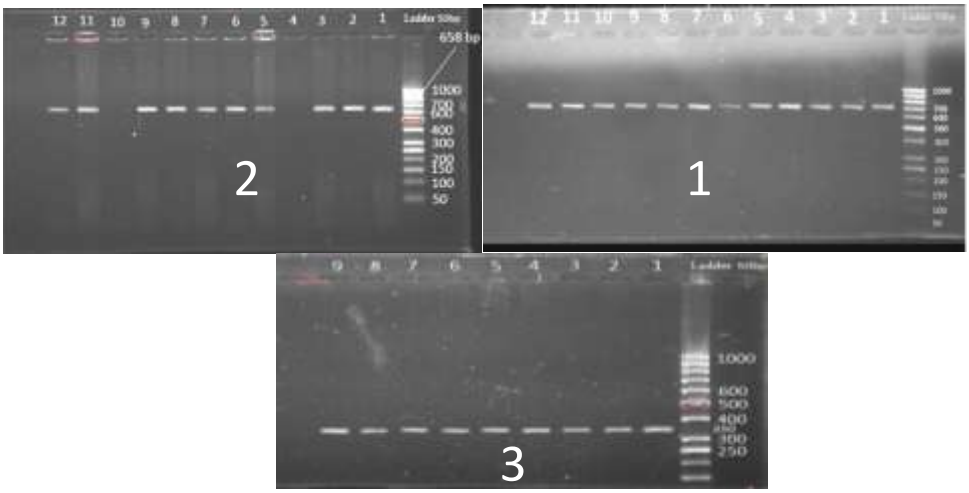
اذ يمثل A .الحامض النووي لعزلات الفطر *R . solani*

B.الحامض النووي لعزلات الفطر *F. solani*

C.الحامض النووي لعزلات الفطر *M. phaseolina* .

4-3-2.تفاعل تضخيم السلسلة Polymerase Chain Reaction PCR

اظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لتضخيم دنا العزلات الاثنى عشر للنوع *R . solani* باستخدام الزوج البادیء التشخيصي (ITS1/ITS4) ونتائج الهجرة الكهربائية باستعمال الاكاروز بتركيز 1.5% حزم بحجم 700bp لجميع العزلات الداخلة في التفاعل وهذا هو الحجم المتوقع الذي ينتجه هذا الزوج من البادئات وهذه النتيجة تؤكد ان الفطر المعزول هو *R . solani* والتي تتضمن 12 عزلة كما هو مبين في الشكل (5-1) وتتفق هذه النتيجة مع تلك النتائج التي توصل اليها Helmy واخرون (32) الذي قام بتشخيص 131 عزلة من الفطر *Rhizoctonia solani* من جذور نبات الباقلاء باستخدام البادئ التسلسلي ITS1-ITS4 وبنفس الوزن الجزيئي. كما اعطت نتائج التفاعل لتضخيم دنا العزلات للنوع *F. solani* باستخدام الزوج البادئ التشخيصي (TEF-F.s4F/ TEF-F.s4R) حزم ل10 عزلات من اصل 12 عزلة والتي تشمل (12,11,9,8,7,6,5,3,2,1) العشر بحجم 658bp كما موضح بالشكل (5-2) وهذا هو الحجم المتوقع الذي ينتجه هذا الزوج من البادئات وهذه النتيجة تؤكد ان العزلات التي اعطت حزمة عند هذا الحجم الجزيئي هو الفطر *F. solani* وهذه النتائج تتفق مع ما حققه Arif واخرون (18) ان استعمال التقانة الجزيئية باستخدام جهاز ال PCR خفف العناء في تشخيص انواع من الفطريات العائدة الى الجنس *Fusarium* SPP. وخاصة النوع *F. solani* والمعزولة من انواع مختلفة من النباتات اذ استخدم الجين TEF-1α الخاص لهذا الغرض. ولوحظ أيضا من خلال التفاعل لتضخيم دنا العزلات للنوع *M. phaseolina* باستخدام الزوج البادئ التشخيصي (MpKF/MpKR) ظهور حزم لجميع العزلات المستعملة في التفاعل بحجم 350bp وهذا هو الحجم المتوقع الذي ينتجه هذا الزوج من البادئات وتؤكد هذه النتيجة ان جميع هذه العزلات هي تابعة للفطر *M. phaseolina* كما هو مبين في الشكل (5-3) وتتفق هذه النتائج مع ما حصل عليها Babu واخرون (19) من ان استعمال البادئ الخاص بالفطر *M. phaseolina* MpKFI – MpKRI اعطى حزمة لهذا التفاعل بحجم 350bp.



صورة 5. الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز بتركيز 1.5% لنواتج تضاعف الـDNA
حيث تمثل الصورة 1- لعزلات الفطر *R . solani* (1-12)،
2-عزلات الفطر *F. solani*
3- (12,11,9,8,7,6,5,3,2,1) وعزلات الفطر *M. phaseolina* (1-9)

4-4.اختبار المقدرة الأمراضية لبعض الفطريات المعزولة

4-4-1. الكشف عن العزلات الممرضة باستعمال بـذور الفجل

اتضح من نتائج الجدول (6) إن جميع عزلات الفطريات المختبرة سببت خفض معنوي في النسبة المئوية للانبات قياساً بمعاملة المقارنة والتي بلغت النسبة المئوية لانبات البذور فيها 98.67% وقد تفوقت بعض عزلات الفطر *R . solani* و *F. solani*. و *M. phaseolina* التي شملت RS-1، RS-4، RS-5، RS-7، RS-8، RS-10 و FS-3، FS-6، FS-7، FS-14 ، و MP-9، MP-15 بمقدرتها الإمراضية في خفض النسب المئوية للانبات عن باقي العزلات إذ بلغت 0% في حين حققت العزلات الاخرى خفض معنوي بنسبة انبات بنسب متفاوتة تراوحت بين 2.67-57.33% وتتفق هذه النتائج مع ما وجده الجبوري (1) وجبر والربيعي (10) وعبدو وآخرون (12) من ان معظم الفطريات المختبرة المسببة لمرض تعفن جذور النباتات المفحوصة أحدثت خفضاً معنوياً بنسبة انبات البذور في الوسط الزرعي قياساً بمعاملة المقارنة.

جدول(6) الكشف عن العزلات الممرضة المرافقة لجذور وقواعد سيقان الباقلاء المصابة باستعمال بذور الفجل.

المعاملات	نسبة الانبات	المعاملات	المعدل	نسبة الانبات	المعدل
RS-1	0.00	MP-15	0.00	MP-7	24.00
RS-4	0.00	RS-2	2.67	FS-9	25.33
RS-5	0.00	FS-5	5.33	FS-13	25.33
RS-7	0.00	RS-6	8.00	MP-3	25.33
RS-8	0.00	FS-1	8,00	MP-8	25.33
RS-10	0.00	MP-1	9.33	FS-2	29.33
FS-3	0.00	RS-14	10.67	RS-12	30.67
FS-6	0.00	FS-10	10.67	MP-6	44.00
FS-7	0.00	RS-13	13.33	MP-13	57.33
FS-14	0.00	MP-2	13.33	المقارنة	98.67
MP-9	0.00	RS-15	14.67	L.S.D.	7.14

صورة 6.تأثير الفطريات الممرضة في انبات بذور الفجل في الوسط الزرعي الأكر والماء قياساً بالانبات الطبيعي في معاملة المقارنة.

اختبار تأثير بعض الفطريات الممرضة في إنبات بذور الباقلاء وبادراتها

اشارت نتائج هذه التجربة (الجدول 7) الى التفاوت بين العزلات في خفض نسب الانبات والتغاير في شدة الاصابة لذا تم انتخاب عزلة واحدة من كل فطر لاستعمالها في التجارب اللاحقة والتي تشمل RS-8 و FS-6 و MP-9. تشير النتائج الى ان جميع العزلات اظهرت قدرة امراضية عالية في اصابة البادرات ولكنها

تباينت في قدرتها الامراضية وهذا يتفق مع ما وجده جبر (9) و الجبوري، (1) والمسعودي (7) و El Gamalو El Shamy (24) .

جدول (7) تاثير بعض العزلات الفطرية في انبات بذور الباقلاء

المعاملات	نسبة الانبات	شدة الاصابة%	المعاملات	نسبة الانبات	شدة الاصابة%
RS-5	0.00	100.00	FS-3	46.67	83.33
RS-8	0.00	100.00	FS-5	46.67	80.00
RS-10	0.00	100.00	FS-10	46.67	78.33
RS-4	6.67	98.33	MP-2	46.67	76.67
RS-1	20.00	91.67	FS-1	53.33	76.67
RS-7	20.00	91.67	FS-9	53.33	75.00
RS-13	20.00	91.67	FS-13	53.33	73.33
RS-2	26.67	90.00	MP-6	53.33	73.33
RS-6	26.67	90.00	MP-13	53.33	71.67
RS-15	26.67	90.00	MP-15	53.33	71.67
FS-6	26.67	90.00	FS-2	60.00	70.00
RS-12	33.33	86.67	MP-1	60.00	68.33
RS-14	33.33	86.67	MP-8	60.00	65.00
FS-7	33.33	85.00	MP-7	66.67	58.33
FS-14	33.33	83.33	MP-3	73.33	51.67
MP-5	33.33	83.33	المقارنة	100	3.33
MP-9	33.33	83.33	L.S.D.	26.59	14.89

كل رقم يمثل معدل لثلاثة مكررات

تاثير بعض المستخلصات النباتية في تثبيط عـزلات الفطريات المسببة لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء على الوسط الزرعي PDA

اظهرت النتائج الموضحة في الجدول (8) ان المستخلص المائي للزيج والالبيزيا وعرف الديك وبالتراكيز (5 و10 و 15%) له فعالية تثبيطية ضد الفطريات الممرضة المدروسة *R . solani* و

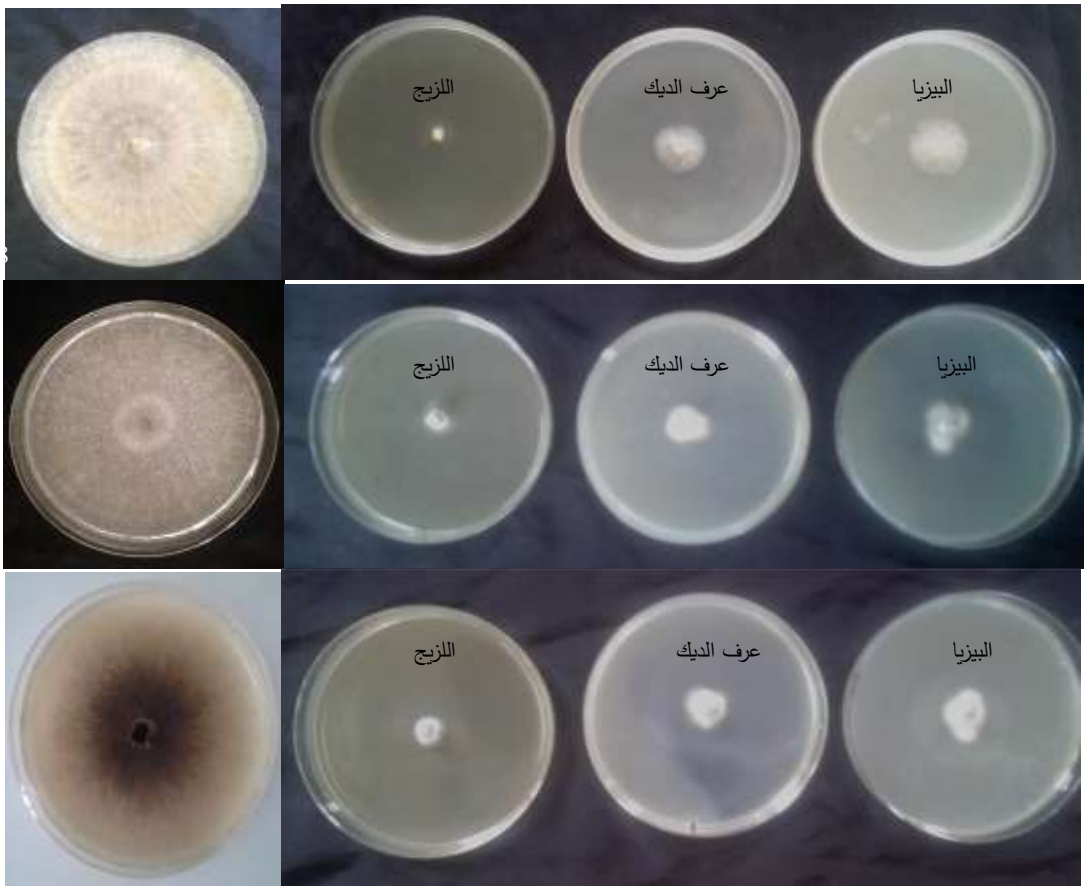
F.solani و *M. phaseolina* قياسا بمعاملة المقارنة بدون المستخلص فقد بلغت النسبة المئوية لتثبيط الفطريات اعلاه لجميع المستخلصات عند التركيز 15% (100،91.47 ، 88.17 و 68.87، 77.07 ، 73.32و 85.57، 85.20 ،82.57%) على التوالي وبلغت عند التركيز 10% (80.37،79.27 ، 81.47و 61.47،64.80 ،60.37 و 66.33،71.83 ،68.87 %) وفي التركيز 5% بلغت (71.47 ، 65.53،57.43 و 42.93 ،41.83، 41.47 و 54.80، 49.63، 46.70%) على التوالي. ومن خلال هذه النتائج يتضح تفوق مستخلص اوراق نبات اللزيج معنويا في جميع تراكيزه المضافة الى الوسط الزرعي والمعامل بها الفطريات الممرضة اعلاه، يليه في الفعالية مستخلص اوراق نبات عرف الديك حيث اثبت تفوقه على مستخلص اوراق شجرة الالبيزيا وبفروق معنوية، قياسا بمعاملة المقارنة.

جدول (8) تاثير المستخلص المائي لنباتات اللزيج (الحسك) والالبيزيا وعرف الديك في نمو الفطريات الممرضة *R . solani* و *F.solani* و *M. phaseolina* على الوسط الزرعي PDA

المستخلصات النباتية	تركيز المستخلص %	R.s-8		F.s-6		MP-9	
		معدل النمو	نسبة التثبيط %	معدل النمو	نسبة التثبيط %	معدل النمو	نسبة التثبيط %
اللزيج	5	2.57	71.47	3.83	57.43	3.10	65.53
	10	1.77	80.37	1.87	79.27	1.67	81.47
	15	0.00	100.00	0.77	91.47	1.07	88.17
الالبيزيا	5	5.13	42.93	5.23	41.83	5.27	41.47
	10	3.47	61.47	3.17	64.80	3.57	60.37
	15	2.80	68.87	2.07	77.07	2.40	73.32
عرف الديك	5	4.07	54.80	4.53	49.63	4.80	46.70
	10	3.03	66.33	2.53	71.83	2.80	68.87
	15	1.30	85.57	1.33	85.20	1.57	82.57
المقارنة	0	9.00	0.00	9.00	0.00	9.00	0.00
L.S.D معدل النمو		0.18					
L.S.D. نسبة التثبيط		1.98					

وتعزى الكفاءة التثبيطية العالية لمستخلص اورق نبات اللزيج وعرف الديك والالبيزيا ضد ضد هذه الفطريات كما موضح بالصورة (7) لوجود مركبات الصابونينات والتانينات والراتنجات والفينولات والقلويدات والفلافونات التي لها الفعل التثبيطي لكثير من الاحياء المجهرية كما انها تحمي النبات من الحشرات الضارة

فتساعد على نمو النبات طبيعيا (4). اتفقت هذه النتائج مع ما وجده Marian واخرون (42) تبين مختبريا ان استخدام مستخلص نبات اللزيج كان له تاثير في الاقلال من النمو الاشعاعي للفطرين *Aspergillus ochraceus* و*Acremonium chrysogenum* على الوسط الزرعي PDA. وكذلك بين Abdul Shakoor واخرون (14) ان مستخلص اوراق شجرة الالبيزيا لها فعل تثبيطي للفطرين *Aspergillus niger* و*Aspergillus flavus* .



صورة 7. تاثير المستخلص المائي للنبات اللزيج والالبيزيا وعرف الديك في نمو الفطريات الممرضة على الوسط PDA بتركيز 15%

الكشوفات الكيميائية لبعض المركبات الفعالة في المستخلصات النباتية.

اظهرت نتائج الكشف الكيميائي عن المكونات الفعالة الموجودة في المستخلصات النباتية الخام للزيج والالبيزيا وعرف الديك الجدول (9) احتواء المستخلصات على اغلب المركبات الفعالة الموجودة في النباتات التي تمتلك خواص تضادية ضد الميكروبات. وقد تباين وجود هذه المركبات الفعالة من مستخلص الى اخر فنجد ان المستخلص الخام للزيج احتوى على مركبات القلويدات والصابونينات والتانينات والفلافونيدات والراتنجيات والفينولات وهذه النتائج مطابقة لما وجده Suresh واخرون (54)، حيث ان هذه المركبات تمتلك فعالية تثبيطية عالية ضد انواع من الفطريات مثل *Alternaria zinnia* و*Botrytis cinerea* و*Phoma narcissi* و

Fusarium solani و*phytophthora capsici* و*Fusarium oxysporum* و*solani Rhizoctonia* (35,33.22).

واحتوى مستخلص الالبيزيا الخام على الصابونينات والتانينات والفينولات والفلافونيدات واتفقت النتائج مع ماوجده Rahul واخرون (46). واحتوى مستخلص عرف الديك الخام على الصابونينات والتانينات والراتنجات والفينولات والقلويدات والفلافونات والتثبيطي(47) ، وجاءت هذه النتائج مطابقة لنتائج الدراسات السابقة التي شملت هذه النباتات فقد ذكر Cowan (23) ان استخدام الماء في تحضير المستخلصات الخام كان جيدا في استخلاص العديد من المركبات الفعالة الموجودة في النباتات مثل الصابونينات والتانينات والكومارينات والفلافونات.

جدول (9) الكشوفات الكيميائية لبعض المركبات الفعالة في المستخلصات النباتية

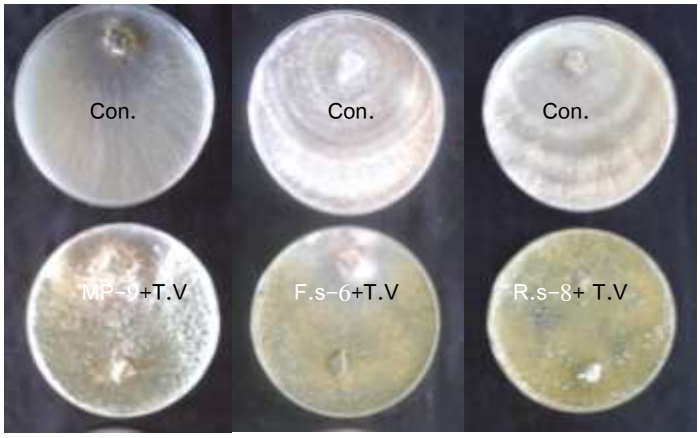
المجموعة الفعالة	طريقة الكشف	النتيجة	اللزيج	البيزيا	عرف الديك
القلويدات	كاشف واكنر	راسب بني	+	–	+
	كشف دارجندوف	راسب برتقالي	+	–	+
	كشف ماير	راسب بني او عكورة	+	–	+
الفلافونات	حامض الكبريتيك المركز	لون اصفر داكن	+	+	+
التانينات	كلوريد الحديديك1%	لون اخضر	+	+	+
الراتنجات	حامض الهايدروكلوريك 4%	عكوره	+	–	+
الصابونينات	ماء مقطر	راسب ابيض	+	+	+
الفينولات	كلوريد الحديديك	لون ازرق	+	+	+

(+) النتيجه موجبة ،(–) النتيجه سالبة

اختبار المقدرة التضادية للفطر *T.viride* ضد عـزلات الفطريات المسببة لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء على الوسط الزرعي PDA

أظهرت النتائج أن فطر المقاومة الأحيائية *T. viride* حقق نسبة تثبيط عالية ضد الفطريات الممرضة المدروسة على الوسط الزرعي PDA مختبريا حيث لوحظ تثبيطه للفطر *R. solani* (RS–8) والفطر *F. solani* (FS–6) بنسبة 100% وبلغت الدرجة 1 اما الفطر الممرض *M. phaseolina* (MP–9) فقد بلغت بنسبة تثبيط 75% اي الدرجة 2 او حسب السلم الذي وضعه Bell واخرون (20) كما مبين بالصورة (14). تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه الرجبو ومحمود (3) من ان الفطر الاحيائي *T. viride* كان اسرع نموا من الفطر الممرض *Rhizoctonia solani* حيث غطى بنموه كامل مساحة الطبق دون السماح للفطر

الممرض بالنمو وهذا يعني ان التضاد من الدرجة 1 او 100%. وقد بين Mallesh واخرون (41) ان المقاوم الحيوي *T. viride* ثبط نمو الفطر *R.solani* بنسبة 94.4% ثم تلاه الفطر الاحيائي *T. harzianum* بنسبة 86.4% وهذا دليل على تفوق العامل الاحيائي *T. viride* وذلك لانتاجه المضاد الحيوي Gliotoxin ذو الفعل المثبط لسبورات الفطريات كما وجد إنه له قدرة تضادية ضد العديد من المسببات المرضية النباتية مثل solani. R، Macrophomina phasiolina، *Fusarium* sp.، *Pythium* spp. (55,39). فضلا عن امتلاكه الية التنافس وسرعة نموه وله القدرة على التطفل حيث يلتف على الخيوط الفطرية لعائله ويخترق جدران الخلايا(38).



صورة 8.القدرة التضادية العالية للفطر*T.viride* ضد الفطريات الممرضة

الاستنتاجات

1-انتشار مرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء في جميع المناطق التي شملها المسح في محافظة بابل.

2- إن المسببات الرئيسة لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء في حقول محافظة بابل هي الفطريات *Rhizoctonia solani* و *Fusarium solani* و *Macrophomina phaseolina* الذي اكد تشخيصها بواسطة تقانة PCR اذ سجلا انتشارا واسعا في اغلب الحقول بالاضافة الى القدرة الامراضية العالية لها.

3- إن استعمال الفطر الاحيائي *Trichoderma viride* ومستخلص نبات اللزيج والالبيزيا وعرف الديك عملا على تثبيط مسببات هذا المرض تحت الظروف المختبرية.

المصادر

1-الجبوري، حرية حسين شهاب (2002). تأثير استخدام معيق النمو كلتارCultar وبعض المستخلصات النباتية على اصابة نبات الباقلاء بمسببات تعفن الجذور . رسالة ماجستير . كلية الزراعة . جامعة بغداد .

2-الرجبو ، مها اكرم محمد علي (2004). دراسة تاثير مستخلص نبات الزعتر .*Thymus* spp على بعض الفطريات. اطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة، جامعة الموصل .

3-الرجبو ، مها اكرم و محمود، نادية قحطان (2013). تاثير المثبط لنمو الفطر*Rhizoctonia solani* باستخدام المستخلص الكحولي لبعض النباتات مجلة علوم الرافدين ، 24 (2) : 13- 23.

4-الشماع، علي عبد الحسين(1989). العقاقير وكيمياء النباتات الطبية. دار الكتب للطباعة والنشر،نينوى العراق.

5-القريشي، منار كريم فاضل(2011). تقييم فاعلية بعض المستخلصات النباتية في نمو بعض الفطريات الممرضة. رسالة ماجستير.كلية العلوم. جامعة كربلاء.

6-المجموعة الاحصائية السنوية(2012). الجهاز المركزي للاحصاء. وزارة التخطيط.العراق.

7-المسعودي،ابتسام محمد حسين(2012).تقييم الدور الحيوي لبعض الأنواع البكتيرية في مكافحة مرض تعفن جذور الباقلاء وتحسين معيار نمو النبات في محافظة بابل.رسالة ماجستير.الكلية التقنية/المسيب.جامعة الفرات الاوسط.

8-جاسم ، ناجي سالم (2007). دراسة مرض تعفن جذور وقواعد سيقان محصول الباقلاء المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* (Kuhn) في محافظة البصرة ومكافحته إحيائياً وكيميائياً . أطروحة دكتورا . كلية الزراعة . جامعة البصرة .

9-جبر ، كامل سلمان(2001). مسح لمرض تعفن جذور وقواعد وسيقان الباقلاء وتشخيص الفطريات المسبب له ومكافحته إحيائياً . مجلة العلوم الزراعية العراقية ، 32(2) : 127-132.

10-جبر، كامل سلمان. حميد عباس الربيعي(2008). تاثير الفطر*Rhizoctonia solani* في انبات بذور القطن ومكافحته باستعمال بعض المستخلصات النباتية. مجلة العلوم الزراعية العراقية 39 (4)-37 : 25.

11-شامي، سامي اغا(1982). دراسة بعض الصفات الدوائية والسمية لأزهار القيصوم. رسالة ماجستير. كلية الطب البيطري. جامعة بغداد.

12-عبدو، رانيا حاج، بسام بياعة وعباس عباس(2012). تحديد المجموعات التشابكية لمجتمع الفطر على البطاطا/البطاطس في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 30: 1-10.

13-علوان، صباح لطيف و فراس علي الركابي (2010). تاثير الفطر *Rhizoctoni solani* ورواشحه على انبات بذور ونمو بادرات الباميا ومكافحتها كيمياويا وحيويا. مجلة الكوفة للعلوم الزراعية. 2(1): 6-1.

14-Abdul S., Amjad U. R. , Gul Z. , Uzma K. , Yasir I. , Abdul A. N. and Muhammad N..(2014). Biological screening of Albizia lebbek L. and Mimosa himalayana Gamble (Mimosaceae) . Journal of Medicinal Plant Research Vol. 8(20): 731-735.

15-Abo-shady,A.M.,Al-ghaffar,B.A.,Rahhal,M.M.H. and Abd-EL M H.A.(2007). Biological Control of Faba Bean Pathogenic Fungi by Three Cyanobacterial Filtrates. Pakistan. Journal. of Biological Sciences 10 (18): 3029-3038

16- Adewale , A.O. ; David, A.A. ; Abiodun , O.O. and O.A, Craig (2007). Studies on antimicrobial, antioxidant and phytochemical analysis of *Urenalobata*leave extract . J. Physical & Natural Sci. 1(2) : 2-9.

17-Al-Khazragi, S.M. (1991). Biopharmacological study of *Artemisia herba Alba.* M. Sc. Thesis. Baghdad University.

18-Arif M., Shilpi C., Zaidi N. W., Rayar J. K. Variar M. and Singh U. S. (2012). Development of specific primers for genus Fusarium and F. solani using RDNA subunit and transcription elongation factor (TEF1?) gene. African Journal of Biotechnology Vol. 11(2): 444-447.

19-Babu, B. K.; Anil K. S.; Alok K. S.; and Dilip K. A. (2007). Identification and detection of Macrophomina phaseolina by using species -specific oligonucleotide primers and probe. Mycologia, 99(6): 797–803.

20-Bell , D. K. , H. D. Well and G. R. Markham . (1982) . In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant Pathogens. PhytoPathology . 72 : 379 – 382 .

21-Bolkan, H. H., and E. E. Butler . (1974). Studies on Heterokaryosis Virulence of *Rhizoctonia solani* . Phytopathology . 64: 513 – 522.

22-Bonanomi , G. Antignani , V. Barile, E. Lanzotti, V. and F. Scala. (2011). Decomposition of *Medicago sativa* Residues Affects Phytotoxicity, Fungal growth and Soil-born Pathogen Disease. Journal of Plant Pathology 93(1): 57- 69.

23-Cowan , M. M. (1999). Plant products as antimicrobiol agents. Clinical Microbiology Reviews, 12 (4) : 564-582 .

24-El Gamal, N. G. and El Shamy, A. R. (2014) Allelopathic impact of some antioxidants on Fusarium solani causing root rot on faba bean (Vicia fabae). Journal of Agricultural Technology 10(4):951-961.

25-El-Mougy, N. S., Aly M. D. I. H., Imbabi E. I. and Abdel-Kader M. M. (2011). First Record of *Sclerotinia* Foliage Blight Disease on Pepper under Protected Cultivation System in Egypt. P roc. 12th Egyptian Phytopathological Society, 3-4. ARC, Cairo, Egypt.

26-FAO. (2006). FAO statistical yearbook 2005-2006, Available at: http://www.fao .org/statistics/ yearbook/vol_1_1/index.asp (online, verified 11 July 2008).

27-Goicoechea, N., Aguirreolea J. and Garcia-Mina J. M. (2004). Alleviation of *Verticillium* wilt in pepper (*Capsicum annuum* L.) by using the organic amendment COA H of natural origin. Scientia Horticulturae, 101: 23-37.

28-Graham, P.H.; and C.P. Vance .(2003). Legumes : Importance and constraints to greater use .plant physiological 131: 872-877 .

29-Green, R. M. and Sambrook, J.(2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition. CSHL Press.

30-Harborne, J.B. (1973). Phytochemical methods. Champman and Hall., London, VK.

31-Harborne,J.B. (1984). Phytochemical methods . Aguide to modern techniques of plants analysis. 2nd. ed. Champan Hall , London, VK.

32-Helmy M. M., Gado E., El-Deeb S., Mostafa H. M.. (2015) Phenotypic Diversity and Molecular Identification of the Most Prevalent Anastomosis Group of *Rhizoctonia solani* Isolated from Diseased Faba Bean Plants. American Journal of Life Sciences. 3 (1): 47-55.

33-Houghton P., N. Patel, M. Jurzysta, Z. Biały, C. Cheung. (2006). Antidermatophyte activity of *Medicago* extracts and contained saponins and their structure-activity relationship. Phytother. Res., 20: 1061-1066.

34-Icarda ,(2003). Faba bean Pathology progress report. food Legume Improvement program. ICARDA. Aleppo. Syria.

35-Jarecka, A, A. Saniewska, Z. Bialy and M. Jurzysta. (2008). The effect of *Medicago sativa* saponins on the growth and development of *Fusarium oxysporum* schlecht F. sp. *Tulipae* Apt. ACTA Agrobatanica 61.(2): 147-155.

36-Kasumbwe, K, Venugopala, K.N, Mohanlall, V. and Odhav, B. (2014). Antimicrobial and antioxidant activities of substituted halogenated coumarins. Journal of Medicinal Plants Research 8(5): 274-281

37-Khanzada, Sh. A., Sh M. Iqbal and A. Akram . (2006). In vitro efficacy of plant leaf extracts against *Sclerotium rolfsii* Saac.Mycopath., 4(1) : 51-53.

38-Khare, A., B. K. Singh and R. S. Upadhyay. (2010). Biological control of *Pythium aphanidermatum* causing damping off of mustard by mutants of *Trichoderma viride* 1433. Journal of Agricultural Technology. 6: 231-243.

39-Krupa P., K. Bandurska; A. Berdowska; M. Myga-Nowak; M. Marczak; A. Godela; S. Bednarek. (2014). Improving the nutritional values of plant products through the use of biological agents such as *Trichoderma viride* in tomato plantations. Journal of Animal &Plant Sciences, 23(3): 3670 - 3676.

40-Kumhar, K. C., Babu, A., Bordoloi M. and Ali A.(2014). Evaluation of culture media for biomass production of *Trichoderma viride* (KBN 24) and their production economics. American Journal of Agriculture and Forestry 2(6): 317-320.

41-Mallesh, S.B.; Narenderappa , T.; Ramanujam, B. (2008). Evaluation of microbial antagonists and organic amendments on root rot of sage Salvia officinalis by *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani*. Karnataka J. Agric. Sci. 21(2) , 301-302.

42-Marian B., Andreea D., Steliana R., Alina B. , Dumitru L. (2013). Testing of the Antifungal Effect of Extracts of burdock, thyme and rough cocklebur. Studia Universitatis "Vasile Goldi Seria. 23(1): 65-69.

43-Mckinney, H.H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporum sativum*. J. Agric. Research 26: 195 – 217

44-Montealegre, J. R.; R.Rodrigo; P.M. Luz.; H. Rodrigo; S.polyana; and B. Ximena. (2003). Selection of bioantagonstic bacteria to be used in biological contro of *Rhizoctonia solani* in tomato.J. Biotec. 6:115 –127.

45-Pommerenke, C.; Musken, M.; Becker, T. and Dotsch, A.(2011). Global genotype phenotype correlation in *Pseudomonas aeruginosa* .Plos. Pathog.6 : 1-8.

46-Rahul, C. ; Pankaj P.; Sarwan S.K. and Mahesh J. K. (2010). Phytochemical screening and antimicrobial activity of Albizzia lebbeck . J. Chem. Pharm. Res. 2(5): 476-484

47-Saad B, Azaizeh H, Abu-Hijleh GH, Said O (2006). Safety of traditional Arab herbal medicine.Evid Based Complement Alternat Med 3: 433-439.

48-Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular a cloning:laboratory manual (2^{th} end) Gold Spring Harbor. New York. USA.

49-Seema, M., S. Reenivas, S. S., Rekha, N. D. and N. S. Deraki, (2011). In vitro studies of some plant extracts against *Rhizoctonia solani* Kuhn Infecting

FCV tobacco in Karnataka Light Soil, Karnataka, India. Journal of Agricultural Technology vol.7(5): 1321-1329.

50-Small, M. (2009). Plant Pathology. Colorado state Uni. Extension, Garden Note # 331. 16pp.

51-Smolinska, U. 2000. Survival of *Sclerotium cepivorum* sclerotia and *Fusarium oxysporum* chlamydospores in soil amended with cruciferous residues. J. Phytopath. 148: 343-349.

52-Sofowora, A. (1993).Screening plants for bioactive agents. In : Medicinal Plantsand Traditional Medicinal in Africa. 2nd. ed. Spectrum Books Ltd. Sunshine House, Ibadan, Nigeria. P: 134-156.

53-Stojsin, V., Budakov, D., Jacobsen, B., Grimme, E., Bagi1, F. and Jasni, S.(2007). Identification of Rhizoctonia solani isolates from Sugar Beet roots by analyzing the ITS region of ribosomal DNA. Proc. Nat. Sci., Matica Srpska Novi Sad. 113,161-171.

54-Suresh, J.; Rajan, Dhanya and Nagamani. (2013) Anti-diabetic activity of aerial parts of Xanthium Strumarium linn. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 3(3): 2185-2200.

55-Talla, S. G., Raju, A. S. R., Karri, S., & Kumar, Y. S. (2015) Production and antagonistic effect of *Trichoderma* spp. on pathogenic microorganisms (*Botrytis cinerea, Fusarium oxysporium, Macrophomina phasealina* and *Rhizoctonia solani*). African Journal of Biotechnology. 14(8): 668-675

56-Trease, G.E. and Evans, W. (2002). Pharmacognosy. 15th. Esaunders

57-Van Leur, J.A.G.; R.J. South well; and J.M. Mackie. (2008). Aphanomyces root rot on faba bean in northern NSW. Journal Australasian Plant Disease