Molecular detection of the fungus *Fusarium solani* and the effect of two types of bacteria *Azotobacter chroococcum* & *Bacillus thuringiensis* in addition to poultry manure and it's pathogenicity on the citrus root

الكشف الجزيئي للفطر *Fusarium solani* وتأثير نوعين من البكتريا *Azotobacter chroococcum* و*Bacillus thuringiensis* وسماد الدواجن على امراضيته لجذور الحمضيات

أ.م.د ابراهيم خليل حسون غادة ماجد الغانمي
قسم المقاومة الاحيائية. الكلية التقنية/المسيب، جامعة الفرات الاوسط
البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

الخلاصة:

تهدف الدراسه الى تأثير نوعين من البكتريا *Azotobacter chroococcum & Bacillus thuringiansis* في حماية شتلات النارنج من الاصابه بالفطر *Fusarium solani* المسبب لمرض تعفن جذور الحمضيات في محافضة بابل. اوضحت نتائج اختبار المقدره الامراضيه لعزلات الفطر*Fusarium* اختلاف العزلات بتاثيرها في نسبة انبات بذور الفجل فقد تراوحت نسبة الانبات من 0 – 4% حيث كانت نسبة الانبات في معاملة المقارنه (بدون فطر ممرض)100%.

واظهرت نتائج التجربه تحت ظروف الظلة الخشبية فاعلية عاملي المكافحه الاحيائيه *Azotobacter chroococcum* و*Bacillus thuringiansis &* وسماد الدواجن بنسبة 15% في خفض شدة اصابة الفطر *F.solani* (F.s1) لشتلات النارنج بعمر سنة اذ خفضت شدة الاصابه الى 8.27% و 9.5% على التوالي قياسا الى معاملة الفطر الممرض بمفرده والتي بلغت شدة الاصابه فيها91.72% ، والذي سبب رفع معدلات النمو في الاوزان الجافه والطريه وطول المجموع الخضري والجذري التي بلغت 16.20 ، 26.50 ، 10.00 ، 4.60 غم/نبات و 86.30 ، 51.70 سم/نبات على التوالي قياسا بمعاملة المقارنه (الفطر الممرض بمفرده) والتي بلغت بلغت فيها معدلات الصفات اعلاه 30.70 ، 10.33 ، 5.00 ، 10.80 غم/نبات و 50.10 ، 19.80 سم/نبات على التوالي

ABSTRACT:

This study is aimed at the effect of t types of bacteria *Azotobacter chroococcum* & *Bacillus thuringiansis* in protection of sour orang seedlings from F.s that causes root rot of citrus trees in babil governorate the result of this test show the infection ability of *fusarium* isolated ; the isolated varied in their effect in germination percentage of cabbage seeds .the germinetien percent varied from 0 – 4 % which it wan 100% in the control treatment (without infection) . on the other hand , the results reflects the feasibility of the experiment factors *A. chroococcum* and *B. thuringiansis* . under the lathhous conditions as well as the pultary manner in reducing the infection intensity of (Fs.1) for one – year old citrus seedling , that it cause reduction up to 8.27% and 9.5 % infection intensity . this however caused an increment in growth characters (fresh weight , dry weight , plant height and root length for 16.20 ، 26.50 gm/plan 4.60, 10.00, & t cm/plant 86.30,51.70 respectively as compared with the control treatment (the fungi com) which recorded 30. 70 ،10.33 gm/plant 10.80, 5.00 , cm/plant & 50.10 ، 19.80 respectively.

المقدمة:

من الناحية الاقتصادية فأن الحمضيات لها مركز مهم في الاقتصاد الزراعي العالمي وتعد احدى اهم اشجار الفاكهة في العالم وتحتل الموقع الاول في الانتاج العالمي (1). اذ شكل انتاج الحمضيات خلال الفترة من 1996 الى 2005 حوالي 20% من انتاج الفاكهة على المستوى العالمي وتراوحت الكمية المنتجة عالمياً حوالي 89مليون طن لعالم 2004 . تنتج الحمضيات في 104دولة ويتركز 70% من الانتاج في النصف الشمالي من الكرة الارضية وبشكل رئيس في البرازيل وبلدان حوض البحر الابيض المتوسط والولايات المتحدة والصين اذ يشكل مجموع انتاج هذة البلدان اكثر من ثلثي انتاج العالم (2).

اما من الناحية الاقتصادية فتعد اشجار الحمضيات احدى اهم اشجار الفاكهة في العالم ولها مكانة مهمة اذ تحتل الموقع الاول في مجموع الانتاج العالمي الذي بلغ عام 1999 حوالي 98258000 طن (1) .

تمتاز ثمار الحمضيات بقيمتها الغذائية والطبية العالية فهي غنية بالاملاح المعدنية مثل البوتاسيوم والكاليسيوم والحديد والمغنيسيوم والصوديوم والكبرت والفسفور ، كما انها غنية بفيتامين C والثايمينB1 والرايبوفلافين B12 وتحتوي على السكريات والاحماض العضوية كحامض الستريك ويرجع لها الطعم الحامضي المنعش (3).

ويعزى سبب التدهور الى مرض تعفن الجذورroot المتسبب من الفطري*Phytophthora citrophthora* (4) وكذلك الفطر*Fusarium solani* الذي يكاد يكون هو الفطر السائد من بين الفطريات المعزولة من جذور الحمضيات بتكرار عالٍ حتى من الأشجار التي تبدو عليها الاصابة.

وفي العقود الاخيرة نالت المكافحة الاحيائية للمسببات المرضية اهتماماً واسعاً باستعمال بعض الاحياء المضادة ومن بين تلك الاحياء الانواع العائدة للجنس *Trichoderma* ومنها الفطر *T. harzianum* والبكتريا *Bacillus* اذ حققت نجاحاً على مستوى تجارب البيت الزجاجي والحقل (8 و 7 و 6 و 5) . تساهم بكتيريا *A.chroococcum* ومن خلال وجودها في التربة ومنطقة حول الجذور Rhizosphere بتوفير حماية للنبات من الإصابة بالعديد من المسببات المرضية الموجودة في التربة Soil-borne Pathogens من خلال تأثيراتها المباشرة وغير المباشرة في مجتمعات الإحياء الممرضة بواسطة منافستها على المكان والمواد الغذائية ومنع وصول المسبب المرضي لمناطق الإصابة. (9)

المواد وطرق العمل

عزل الفطر وتشخيصة :-

تم اخذ بعض العينات من جذور اشجار النارنج التي ظهرت عليها أعراض الإصابة من بعض البساتين في محافظة بابل إلى المختبر وغسلت بالماء الجاري لمدة 15 دقيقة وقطعت بحجم 0.5سم وعقمت سطحياً بمــحلول هايبوكلورات الصوديوم (1%) لمدة 3 دقائق بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم وجففت بورق الترشيح ونقلت بواسطة ملقط معقم وزرعت بواقع 4 قطع في كل طبق بتري قطر 8.5 سم حاو على 15-20 سم3 من الوسط الزرعي(PDA) المعقم المــضاف إلية المــضاد الحيوي Tetracycline بتركيز 200ملغم

حضنت الأطــباق في 25±2 م° لمدة 7 أيام ، وبعدها تم إجراء الفحص للتحري عن وجود الفطريات المرافقة وإحصائها وتنقيتها بنقل قطع صغيرة من أطراف الخيوط الفطرية ووضعها في مركز طبق بتري حاو على الوسط الزرعي PDA حضنت الأطباق لمدة 7 أيام (10) ثم حفظت العزلات في أنابيب اختبار حاوية على الوسط الزراعي(PDA) شخصت الفطريات لمستوى الجنس والنوع بعد ظهور النموات الفطرية اعتماداً على صفات المستعمرة الفطرية وطبيعة الغزل الفطري والابواغ والتراكيب التي تكونها وباستخدام المفاتيح التصنيفية المعتمدة ومنها (11و 12 و 13).

الكشف عن العزلات الممرضة باستعمال بـــذور اللهانة

تم اختبار المقدرة الامراضية لعزلات من الفطر *F. solani* وذلك حسب طريقة (14) حضرت أطباق بتري قطرها 8.5 سم تحوي على 15 – 20 مل مـــن الوسط الزرعي الاكر والماء المعقم (20غم اكر ، 1 لتر ماء مقطر) والمضاف له المضاد الحيوي (SAMACYCLINE) 200ملغم/لتر . لقحت الاطباق في مركزها بقرص (0.5 سم) من مزارع الفطريات المنماة على الوسط الزرعي PDA بعمر7أيام كل على انفراد. وحضنت الأطباق في درجة حرارة 25±2 م° ولمدة 3-5 أيام، بعدها زرعت بذور لهانة محلية معقمة سطحياً بمحلول هايبوكلورات الصوديوم (1%) وبصورة دائرية قرب حافة الطبق وبمعدل 25 بذرة / طبق. كررت المعاملات ثلاث مرات فضلاً عن معاملة المقارنة (من دون الفطر) وحضنت بدرجة حرارة 25±2 م° وبعد 7 ايام جرى حساب النسبة المئوية للإنبات.

تحضير لقاح الفطر *Fusarium solani*

تم تلقيح اطباق بتري تحتوي على الوسط الزرعي (PDA) بوضع قطعة قطر5 ملم من مستعمرة الفطر المحفوظة وبأربعة مكررات لكل عزلة وحضنت الاطباق عند درجة حرارة 25 ± 2ْم لمدة 7 ايام اخذت بذور دخن محلية *Panicum miliaceum* وغسلت جيداً للتخلص من الشوائب والاتربة ثم نقعت البذور لمدة 6 ساعات بعدها ازيل الماء الزائد وذلك بترشيحها بقطعة قماش . وزعت البذور في دوارق زجاجية سعة 250 مل وبمعدل 50 غم / دورق وعقمت الدوارق بالموصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 1.5كغم /سم^2 لمدة 20 دقيقة وبعد تبريد الدوارق لقحت بلقاح عزلة الفطر*F.solani* وبمعدل 4 اقراص قطر5 ملم/دورق بعمر 7 ايام (اربع مكررات لكل عزلة) حضنت الدوارق تحت درجة حرارة 25 ± 2ْم لمدة اسبوعين و رجت الدوارق مرة كل 5 ايام لضمان التهوية وتوزيع لقاح الفطر على جميع البذور (15).

الخصائص الجزيئية Molecular Characteristics

اجريت هذة الدراسة في مختبرات شركة جسر المسيب في محافظة بغداد وهي الوكيل الحصري لشركة بايونير (Bioneer)في العراق ، دُرست الخصائص الجزيئية للفطر *Fusarium* من خلال استخدام باديء متخصص Specific primer يعرف بإسم (primerTEF). حيث استخدم هذا الباديء لتشخيص الفطر*F. solani* من خلال تضخيم المنطقة المعروفة بإسم (TEF)Transcription elongation factor الموجودة في الحامض النووي DNA لهذا الفطر والمستخدمة كوسيلة تشخيصية لة باستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي PCR.

- **خليط تفاعل البلمرة Master Mix**

استخدمت العدة المجهزة من قبل شركة Bioneer نوع Accupower® PCR PreMix
والتي تتضمن المكونات الأتية:-

- 1U من انزيم البلمرة Top DNA Polymerase.
- deoxyNucleotidesTriphosphate (dNTP) والتي تتضمن 250 مايكرومول لكل من dATP, dCTP, dGTP, (dTTP).
- 10 ملي مول من Tris-HCl (pH 9.0).
- 30 ملي مول من KCl.
- 1.5 ملي مول من MgCl2.
- Stabilizer and tracking dye.

حُفظ خليط تفاعل البلمرة بدرجة حرارة 25 مْ لحين الإستعمال.

محاليل إستخلاص الـ DNA DNA Extraction Kit

استخدمت عدة استخلاص وتنقية الـ DNA المجهزة من قبل شركة Promega الأميركية والتي تتضمن المحاليل الأتية:-

- DNA Rehydration Solution
- Protein Precipitation Solution
- Cell Lysis Solution
- Nucleic Lysis Solution
- RNAs Solution

حُفظت محاليل الاستخلاص والتنقية بدرجة حرارة 2-8 مْ لحين الإستعمال.
انزيم الـLyticase

استخدم الانزيم المجهز من شركة US Biological الأميركية لغرض تكسير الجدار الخلوي. حُفظ الانزيم بدرجة حرارة 4 مْ لحين الإستعمال.
ايزوبروبانول Isopropanol
ايثانول بتركيز 70%

خطوات عملية الـPCR لتشخيص الفطر *Fusarium solani*:

البادئ الذي استخم في عملية التضخيم للكشف عن نوع السلالة للفطر*F.solani*
استخدم البادئ المبين في الجدول(1) في تحديد التسلسل الخاص للقطعة الجينية(TEF)Transcription elongation factor الذي جهز من شركة Alpha DNA

جدول(1) البادئ المستخدم في الدراسة

Primer	Nucleotide sequence F-5__3 R-5__3	Length (Mer)	Anneling Temp. C	Sise of product
TEF	ATCGGCCACGTCGACTCT	18	55	542-658 Kb
	GGCGTCTGTTGATTGTTAGC	20	52	

تشخيص سلالة الفطر جزيئياً بأستعمال تقانة الـ PCR:-

نمي الفطر على وسط PDA الصلب الموضوع في اطباق بتري وبفترة حضن 5 ايام وذلك لغرض استخلاص الحامض النوويDNA وتم الاستخلاص كما يلي:

اولاً- استخلاص الحامض النووي DNA وتنقيته:

1- طحن قطعة من خلية الفطربحجم 100-500 مل (وزن طري) مايسليوم/سبور في النتروجين السائل وذلك باستحدام مدقة ونقل العينات المطحونة الى انابيب اختبار زجاجيه نظيفة وصغيرة بحجم 1.5مل

2-اضيف 180مايكروليتر بفر ةاضم و20 مايكروليتر protinese K للعينة وحرك بلطف لغرض المزج وحضن بدرجة حرارة 56^0 لمدة 30-60 دقيقة

3-اضيف 100 مايكروليتر من بفرPF وحرك بلطف وحضن في درجة 20^0 لمدة 5 دقائق

4-نبذت مركزياً بسرعة12000 دورة/دقيقة لمدة 5دقائق ونقل الطافِ الى انبوبة جديدة سعة 1.5 مل

5-اضيف 200 مايكروليتر بفرBD وحرك بلطف للمزج

6-اضيف 200 ايثانول(96- 100%) وحرك بلطف

7-ونقل المخلوط الى 10 -EZ ووضع في انابيب الجمع 2مل.ونبذت مركزياً بسرعة 9000دورة/دقيقة لمدة 1 دقيقة

8-اضيف 500 مايكروليتر محلول PW ونبذ مركزياً بسرعة 9000 دورة/دقيقة لمدة 1 دقيقة

9-اضيف500 مايكروليتر من محلول الغسل وخفف مع الايثانول ونبذ مركزيا بسرعة 9000 دورة/دقيقة لدة 1 دقيقة

10-نبذ المخلوط بدورة9000 دورة/دقيقة لمدة 2 دقيقة وذلك ليجف الغشاء وبعدها نقل محتوى العمود الى انبوب النبذ المركزي سعة 1.5مل

11-اضيف 100- 500 مايكروليتر بفرTE مباشرةً الى منتصف غشاء10-EZ وحضن لـ1 دقيقة وثم نبذت مركزياً 9000 دورة/دقيقة لـ1 دقيقة لأزالة الـ DNA

ثانياً: الكشف عن الحامض النووي منقوص الاوكسجين(DNA):

استخدمت طريقة الترحيل الكهربائي Electrophoresis بإستعمال هلام الأكاروز بتركيز 1% للكشف عن الحامض النووي منقوص الأوكسجين وكانت المحاليل المتطلبة هي:

- Agarose
- TBE buffer
- Bromophenol blue
- Ethidium bromide
- DNA marker

تم الكشف عن الحامض النووي منقوص الأوكسجين حسب طريقة (16) والتي تتضمن ثلاث مراحل هي:

1- تحضير هلام الاكاروزPrepration of Agarose Gel

- وضع 100مل من دارئTBE في وعاء زجاجي
- اضيف غرام واحد من الاكاروز الى الدارئ
- وضع الدارئ على الـ Microwave الى حد الغليان وذوبان جميع المكونات
- رفع الهلام من التسخين وترك ليبرد حتى 50- 60 ^{0}م

2- تحضير قالب هلام الاكاروز:

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

3- تحميل الـ DNA على قالب هلام الاكاروز

- اضيف9 مايكروليتر من الحامض النووي منقوص الاوكسجين الى 3 مايكروليتر من صبغةLoading Dye DNA وثم وضع المزيج في حفر الهلام
- شغل جهاز الترحيل الكهربائي بفرق جهد 70 فولت وبتيار 100 ملي امبير وترك سريان الصبغة الى الجانب الاخر من قالب هلام الاكاروز
- بعد اكتمال الترحيل الكهربائي وضع هلام الاكاروز على وحدة الاشعة فوق البنفسجية UV وفحصت حزم DNA المتداخلة مع الصبغة

ثالثاً- طريقة عمل تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

استخدمت تقانة PCR لتضخيم المنطقة المعروفة بأسم (**TEF**) باستخدام البادئ المذكور انفآ اذ نفذ طريقة العمل بحجم 20 مايكروليتر وكما موضح في الجدول 2

جدول(2) مواد تفاعل البلمرة المتسلسل

المواد	الحجم (مايكروليتر)
Master Mix	5
Primer Forward	2
Primer Reverse	2
DNA	5
Nuclease free water	اكمل الحجم الى 20
Total	20

بعد اكتمال الاضافات جميعها نبذت العينات مركزياً بواسطة جهاز النبذ المركزي الخاص بأنابيبPCR ونقلت الى جهاز البلمرة الحراري PCR Thermal Cycler وضبط الجهاز على البرنامج التالي كما في الجدول3

جدول(3) برنامج جهاز البلمرة الحراري

ت	خطوات	الحرارة(م)	الزمن	عدد الدورات
1	Initial Denaturation	95	mint5	1
2	Denaturation	95	sec30	
3	Annealing	50-62	sec30	
4	Elongation	72	sec30	35
5	Final Extention	72	mint5	1

رابعاً- الترحيل الكهربائي للناتج:

استخدمت الطريقة السابقة نفسها للكشف عن ناتج عملية التضخيم ولكن هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وليس 1% مع استخدام محلول(Ladder DNA (100 bp لغرض المقارنة.

تحضير عالق البكتيريا *A. chroococcum* و *B . thuringiensis*

تم الحصول على البكتريا من مخبر المقاومة الاحيائية في الكلية التقنية/مسيب، حضرت كمية من العالق البكتيري وإستعملت في تجارب الظلة الخشبية حيث نميت البكتريا على وسط التنشيط السائل Nutrant Broth (N.B) بوضع 50 مل من هذا الوسط في دورق زجاجي حجم 100 مل ولقح بالبكتريا المأخوذة من مزرعة بعمر يوم واحد وللحصول على كمية اكبر من اللقاح لتجارب الظلة استعملت دوارق مخروطية حجم 250 مل تحتوي على100 مل من وسط التنشيط السائل المعقم وحضنت الدوارق الملقحة في حاضنة بدرجة حرارة 37 ْم ولمدة 48 ساعة .

تحديد التركيز الفعال من العالق البكتيري *A. chroococcum* و *B. thuringiensis* المثبط لنمو الفطر الممرض *F.solani*

وذلك باخذ 1 مل من الوسط السائل النامية فية البكتريا بعمر 1 يوم بوساطة ماصة معقمة واضيف الى انبوبة اختبار تحتوي على 9 مل ماء مقطر معقم وتم تلقيح كل الانابيب وذلك بأخذ 1 مل من الأنبوبة الأولى واضافتها الى الانبوبة الثانية بوساطة ماصة معقمة كررت العملية على باقي الأنابيب للحصول على سلسلة من التخافيف 10^{-1}....10^{-9} بعدها جرى تلقيح الأطباق الحاوية على الوسط الزرعي PDA بأخذ 1 مل / طبق من كل تخفيف من العالق البكتيري على شكل بقع دائرية وضع في مركزها قرص بقطر 0.5سم أخذ من قرب حواف مستعمرة الفطر *F.solani* عزلة F.s1 والمنماة على الوسط PDA بعمر7 أيام وتركت أربعة أطباق لكل عزلة للمقارنة من دون تلقيح بالبكتريا أضيف لها 1 مل ماء مقطر معقم (17) وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 25±2 مْ لمدة 3 أيام بعد ذلك تم حساب مقدار التثبيط وذلك بحساب قطر مستعمرة الفطر النامي في معاملة البكتريا ومقارنتها بقطر مستعمرة الفطر النامي في معاملة المقارنة ، حسبت النسبة المئوية لتثبيط النمو الفطري وفق معادلة (18)

$$\% \text{ لتثبيط النمو الفطري} = \left[1 - \left(\frac{\text{النمو الفطري في معاملة البكتريا}}{\text{النمو الفطري في معاملة المقارنة}}\right)\right] \times 100$$

تقييم كفاءة العوامل الاحيائية في شدة الإصابة بالفطر الممرض *F.solani* لشتلات نبات النارنج تحت ظروف الظلة الخشبية

تم احذ نباتات بعمر السنة وأجري هذا الأختبار باستعمال أصص بلاستيكية بقطر 20 سم وارتفاع 15 سم وسعة 2.5 كغم تربة مزيجية ، وضع في كل أصيص 2 كغم تربة معقمة بالمؤصدة تحت درجة 121˚م و ضغط 1.5 كغم / سم² لمدة ساعة ، تركت التربة لمدة 7 أيام ثم وزعت بالاصص و بواقع شتلة واحدة لكل أصيص وبثلاثة مكررات للمعاملة الواحدة ، تضمنت التجربة المعاملات الاتية:-

1. الفطر بمفردة
2. الفطر + سماد دواجن 10%
3. الفطر + سماد دواجن 15%
4. الفطر + سماد دواجن 20%
5. الفطر + بكتريا *A. chroococcum*
6. الفطر + بكتريا *B. thuringiensis*
7. الفطر + بكتريا *A. chroococcum* + سماد دواجن 10%
8. الفطر + بكتريا *A. chroococcum* +سماد دواجن15%
9. الفطر + بكتريا *A. chroococcum* +سماد دواجن 20%
10. الفطر+ بكتريا *B. thuringiensis* +سماد دواجن 10%
11. الفطر + بكتريا *B. thuringiensis* +سماد دواجن 15%
12. الفطر + بكتريا *B. thuringiensis* +سماد دواجن 20%
13. سماد دواجن 10%
14. سماد دواجن 15%
15. سماد دواجن 20%
16. بكتريا *A. chroococcum*
17. بكتريا *B. thuringiensis*
18. بكتريا *A. chroococcum* + سماد دواجن 10%
19. بكتريا *A. chroococcum* + سماد دواجن 15%
20. بكتريا *A. chroococcum* + سماد دواجن 20%
21. بكتريا *B. thuringiensis* + سماد دواجن 10%
22. بكتريا *B. thuringiensis* + سماد دواجن 15%
23. بكتريا *B. thuringiensis* + سماد دواجن 20%
24. المقارنة

فقد اضيف الفطر الممرض *F. solani* المحمل على بذور الدخن بنسبة 1% (وزن/ وزن) بعد تحميلة على بذور الدخن المحلي. بالنسبة لعالق البكتريا *A. chroococcum* وعالق بكتريا *B.thuringiensis* فقد أضيف مع ماء الري بمعدل 100مل/ نبات (19) بتركيز 5×10^8 و 6×10^8 وحدة تكوين مستعمرة / مل على التوالي قبل أسبوع من التلويث بالفطر الممرض ، بينما معاملة المقارنة (بكتريا بمفردها) لم يتم إضافة فطر ممرض لها (6) . اما سماد الدواجن فقد اضيف عند بدء التجربة بثلاث نسب 10% و15% و20% وقد تم اضافتة بمفردة وكذلك مع الفطر الممرض وكذلك مع البكتريا(العامل الاحيائي) وكذلك اضيف السماد مع الفطر مع البكتريا لمعاملات التجربة.

بدأت التجربة في 2014/8/1 ثم حسبت النتائج بعد 104يوم من بدء التجربه في 2014/11/4 من حيث النسبة المئوية لشدة الاصابة بالفطر الممرض F.s1 ومعايير النمو المتمثلة بالوزن الطري والجاف واطوال النباتات للمجموعين الجذري والخضري للنباتات، واعتمد في هذة التجربة التصميم العشوائي (CRD).

وحسبت شدة الاصابة حسب الدليل المرضي المكون من خمس درجات وهي:

0- نبات سليم اوراق خضراء ومجموع جذري كبير وابيض اللون.

1- تلون بسيط على الجذور ومجموع جذري كبير نسبيا واصفرار بسيط على الاوراق السفلية.

2- تحول لون معظم الجذور الى اللون البني الفاتح واصفرار الاوراق السفلية مع جفاف حوافها.

3- تلون الجذر بلون بني مع تساقط الاوراق السفلية.

4- موت النبات.

وحسبت النسبة المئوية لشدة المرض حسب معادلة (20).

$$\% \text{ لشدة المرض} = \frac{(\text{عدد النباتات في الدرجة } 0 \times 0) + (\text{عدد النباتات في الدرجة } 1 \times 1) + \dots + (\text{عدد النباتات في الدرجة } 4 \times 4)}{\text{عدد النباتات الكلي} \times \text{اعلى درجة اصابة}} \times 100$$

النتائج والمناقشة-

العزل وتشخيص الفطر:

بينت نتائج العزل من جذور اشجار النارنج التي ظهرت عليها اعراض مرض تعفن جذور الحمضيات المتمثلة بتلون الجذور بلون بني وتعفن قسم منها الى وجود الفطر *Fusarium solani* الذي ظهرت نمواتة في جميع العينات التي جمعت من بعض بساتين الحمضيات في محافظة بابل وبنسبة تواجد عالية بلغت90 -100% كما تمثلت صفات الفطر *F. nisola* في مستعمراتة التي عزلت من جميع العينات بتكوين غزل فطري ابيض الى حليبي . كما اظهر الفحص المجهري تكوين الفطر ثلاثة انواع من الابواغ الكونيدية الصغيرة microconidia وهي اسطوانية الى بيضوية الشكل تنتج من monophielides طويلة تحمل جانبا على غزل فطري هوائي ، وابواغ كونيدية كبيرة macroconidia وةي تكون مغزلية غير متماثلة متغايرة في ابعادةا اما النوع الثالث من الابواغ فهو Chlamydospores التي تنتج مفردة اوبشكل ازواج في فروع جانبية صغيرة ،او وسط الغزل الفطري وبأتباع المفتاح التصنيفي الذي وضعة (21).

الكشف عن العزلات الممرضة للفطر*F.solani* باستعمال بذور اللهانة.

اوضحت نتائج هذا الاختبار (الجدول4) ان كافة عزلات الفطر المختبرة احدثت خفضآ معنويآ في نسبة انبات بذور اللهانة قياساً الى معاملة المقارنة التي بلغت نسبة انبات البذور فيها 100 % . كما تباينت عزلات الفطر *F.solani* فيما بينها في خفض نسبة الانبات اذ كان اكثر هذة العزلات تأثيرآ في انبات بذور اللهانة هي العزلةF1 والتي تم عزلها من بساتين من بعض مناطق محافظة بابل اذ اختزلت نسبة الانبات في معاملتها الى 0% كما حققت العزلتان32 , FF خفضآ معنويآ في تأثيرها في انبات بذور اللهانة اذ بلغت نسبة الانبات في معاملاتها 2% ، 2% على التوالي .فيما كانت نسبة الانبات بتأثير العزلة 4% F4.

جدول(4)اختبار المقدره الامراضيه لعزلات الفطر *F.solani* وتأثيرة في النسبة المئوية لأنبات بذور اللهانة على الوسط Water Agar

الموقع	رمز العينة	النسبة المئوية للإنبات %
السدة (العلكايه)	F.s a	00
السدة (المصايف)	F.s b	2
المسيب(قطاع19)	F.s c	2
المسيب (قطاع6)	F.s g	4
	المقارنه	100
	LSD	*1.406

كل رقم بالجدول يمثل معدل لاربع مكررات

ان الاختلاف بين العزلات العائدة للنوع نفسة في مدى تأثيرها في انبات بذور اللهانة قد يعزى سببة الى تغاير وراثي بسبب اختلاف مناطق جمع العينات او اختلاف في كمية ماتفرزة هذة العزلات من السموم مثل Fusarubinوdihydrofusarubin اذ ان العزلات ذات المقدرة الامراضية العالية تمتاز بأفرازها كمية من هذة المواد الايضية اكبر من العزلات ذات مقدرة امراضية ضعيفة وهذا ما اكدة عدد من الباحثين مثل(22) و(23) .وربما يعود السبب الى اختلاف العزلات في مقدرتها على افراز الانزيمات المحللة للكنين في جدار خلايا العائل مثل Laccase و Lignin peroxidase وما لذلك من اهمية في احداث الاصابة وانتشار سموم الفطر وانزيماتة في تلك الخلايا (24) .

التشخيص بإستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي Diagnosis by Polymerase chain rection technique (PCR)

أجري إختبار تفاعل البلمرة التسلسلي PCR لاربع عزلات (A,B,C,G) تابعة الى النوع *F. solani* بحسب التشخيص المظهري والمجهري وأظهرت نتائج هذا الإختبار (PCR) الجين المستهدف (التشخيص) عند الموقع (658) زوج قاعدي (bp) كما موضح بالشكل1

شكل 1- موقع الجين المستهدف للعزلات التابعه للفطر Fusarium solani

اختبار المقدرة التضادية لبكتريا *A. chroococcum* ، *B. thuringiensis* ضد عزلة الفطر *F.solani* (F1) على وسط PDA :-

أشارت نتائج الجدول (5) الى ان استخدام البكتريا *A. chroococcum* بتركيز 5×10^8 وحدة تكوين مستعمرة / مل أدى الى تثبيط نمو عزلة الفطر الممرض*F.solani* الى79.4%على الوسط الزرعي مقارنة بمعاملة المقارنة حيث بلغت نسبة التثبيط 0.00% قد يعزى التأثير الذي يسببة استعمال هذة البكتيريا في تثبيط نمو الفطريات الممرضة الى مقدرة هذة البكتيريا على انتاج عدد من الانزيمات التي لها القدرة على تحليل جدران خلايا الفطر الممرض ومن هذة الانزيمات انزيم chitinase و laminarinase و glucanase وانتاج مضادات حيوية مثل pyoluteorin ، herbicolin ، phenazin فضلا عن انتاجها مركبات ذات أوزان جزيئية منخفضة تعمل على مقاومة الفطريات الممرضة ومن بينها مركب سيانيد الهيدروجين (HCN) حيث إن وجود هذا المركب بتراكيز عالية يعمل على تثبيط نمو الفطريات الممرضة (25) .

وكذلك أشارت نتائج هذا الجدول الى ان استخدام البكتريا *B. thuringiensis* بأقل تخفيف مثبط لنمو الفطر الممرض و بتركيز 6×10^8 وحدة تكوين مستعمرة / مل أدى الى تثبيط نمو عزلة الفطر الممرض(F.s1) *F.solani* على الوسط الزرعي PDA ، فقد أظهرت العزلة البكتيرية كفاءة عالية في تثبيط النمو الفطر70.6% قياساً بمعاملة المقارنة التي بلغت نسبة التثبيط فيها 0.00% . يعزى التأثير الذي يسببة استعمال هذة البكتيريا في تثبيط نمو الفطريات الممرضة الى افراز إنزيم chitinase من قبل هذة البكتريا مما يؤدي الى تحليل خلايا جدران الفطر الممرض وربما يؤدي إنزيم proteinase نفس الدور الذي يؤدية انزيم chitinase واتفقت هذة النتيجة مع ماوجدة (26) في تثبيط نمو الفطر *Fusarium* .

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{معدل قطر مستعمرة المقارنة} - \text{معدل قطر مستعمرة المعاملة}}{\text{معدل قطر مستعمرة المقارنة}} \times 100$$

جدول(5) اختبار المقدرة التضادية لبكتريا *A. chroococcum* ، *B. thuringiensis* ضد عزلة الفطر *F.solani* (F1) على وسط PDA

المعاملة	معدل قطر المستعمرة	النسبة المئوية للتثبيط
فطر+*A.chroococcum*	1.75	79.4
فطر+*B. thuringiensis*	2.5	70.6
المقارنة فطر بمفردة	8.5سم	00
LSD عند مستوى احتمال0.05	0.117	0.25

كل رقم بالجدول يمثل معدل لاربع مكررات

تقييم فعالية العوامل الاحيائية *A. chroococcum* ، *B. thuringiensis* وسماد الدواجن في خفض شدة اصابة شتلات النارنج بعمر سنة بالفطر الممرض*F.solani* وبعض معايير النمو تحت ظروف الظلة الخشبية:

وبينت نتائج جدول(6) ان معاملة البكتريا*A. chroococcum* مع سماد الدواجن15% وحققت زيادة معنوية في شتلات النارنج بعمر السنة وظهرت هذه الزياده في الوزن الطري والجاف للمجموع الخضري والجذري عن باقي المعاملات اذ كانت 30.50 و 18.40 و 12.70 و6.86غم/نبات و 90.20 و 55.60سم/نبات وتلتها معاملة البكتريا *B. thuringiensis* مع السماد بنسبة15% حيث بلغت 29.20 و 16.87 و 11.50 و6.10غم/نبات و88.80 و54.03سم/نبات وذلك مقارنةً بمعاملة المقارنة حيثث كانت 21.00 و 11.10 و 6.60 و 2.40غم/نبات و 81.60 و 45.90سم/نبات على التوالي ، اما بالسبة لمعاملة البكتريا مع السماد مع الفطر الممرض حيث حققت ايضآ اعلى معدلات في خفض نسبة الاصابة حيث كانت معاملةالفطرالممرض و البكتريا *A. chroococcum* والسماد بنسبة15% افضل من معاملة الفطر الممرض والبكتريا *B. thuringiensis* و السماد بنسبة15% وكذلك افضل من باقي المعاملات حيث كانت على التوالي للوزن الخضري والجذري الطري والجاف وطول المجموع الخضري والمجموع اجذري 26.50 و16.20 و10.00 و4.60 غم/نبات و86.30 و 51.70سم/نبات ومقارنة بمعاملة الفطر بمفردة حيث كانت على التوالي 10.33 و 3.70 و 5.00 و 1.80 غم/نبات و50.10 و19.80سم/نبات، اما بالنسبة لشدة الاصابة فان اقل شدة اصابة كانت 8.27 وذلك في معاملة الفطر مع البكتريا*A. chroococcum* مع السماد بنسبة15%، ويعود السبب الى ماتمتلكة هذة البكتريا من اليات مختلفة للتأثير في المسبب المرضي منها انتاج الأنزيمات كانزيم الكايتنيز والبروتيز والمضادات الحيوية مثل Bacteriocin و Thuricin والسموم منهاdelta-endotoxin التي تعمل على تحلل سايتوبلازم الخيوط الفطرية (24).

جدول(6) تقييم العوامل الاحيائية *A. chroococcum* و *B. thuringiensis* وسماد الدواجن في خفض شدة اصابةشتلات النارنج بعمر سنة بالفطر *F.solani* وبعض معايير النمو تحت ظروف الظلة الخشبية

المعاملات		الوزن الطري (غم/نبات)		الوزن الجاف(غم/نبات)		أطوال النباتات(سم/نبات)	
	شدة الاصابة	للمجموع الحضري	للمجموع الجذري	للمجموع الخضري	للمجموع الجذري	للمجموع الخضري	للمجموع الجذري
فطر F.s بمفردة	91.72	10.33	3.70	5.00	1.80	50.10	19.80
فطر+ سماد دواجن 10%	75.0	19.50	10.73	6.00	2.00	75.00	44.60
فطر+ سماد دواجن 15%	58.3	21.23	11.30	6.70	2.30	76.00	45.50

فطر+ سماد دواجن 20%	66.4	20.30	11.00	6.30	2.20	80.50	45.00
فطر+بكتريا *A.chroococcum*	33.3	22.6	12.40	7.20	2.70	82.10	46.80
فطر+ بكتريا *B. thuringiensi*	41.6	21.50	11.76	6.90	2.50	81.76	46.20
فطر+ *A.chroococcum+* سماد10%	25.00	25.70	15.30	9.40	4.00	85.50	51.00
فطر + *A.chroococcum+* سماد15%	8.27	26.50	16.20	10.00	4.60	86.30	51.70
فطر + *A.chroococcum+* سماد20%	16.6	26.07	15.76	9.77	4.30	86.00	51.30
فطر+ بكتريا *B. thuringiensi* *+سماد10%*	27.00	24.20	14.23	8.50	3.30	84.20	48.40
فطر+ بكتريا *B. thuringiensi +* سماد15%	9.5	25.07	15.00	9.10	3.70	85.03	49.50
فطر+ بكتريا *B. thuringiensi +* سماد20%	18.6	24.77	14.56	8.80	3.50	84.70	49.00
سماد 10% بمفردة	00	22.70	13.00	7.50	2.90	82.90	47.06
سماد15% بمفردة	00	23.50	14.00	8.20	3.10	83.67	48.10
سماد20% بمفردة	00	23.00	13.40	7.70	3.00	83.30	47.60
بكتريا *A.chroococcum* *بمفردة*	00	27.70	17.00	10.40	5.20	87.20	52.80
بكتريا *B. thuringiensi*بمفردة	00	26.76	16.70	10.20	4.90	86.86	52.10
بكتريا *A.chroococcum+* سماد10%	00	29.70	17.20	12.00	6.40	89.07	54.50

بكتريا *A.chroococcum*+ سماد15%	00	30.50	18.40	12.70	6.86	90.20	55.60
بكتريا *A.chroococcum*+ سماد20%	00	30.00	17.80	12.30	6.70	89.60	55.10
بكتريا *B. thuringiensi* + سماد10%	00	28.07	15.73	10.80	5.50	87.70	53.20
بكتريا *B. thuringiensi*+ سماد15%	00	29.20	16.87	11.50	6.10	88.80	54.03
بكتريا *B. thuringiensi*+ سماد20%	00	28.60	16.40	11.20	5.80	88.20	53.70
المقارنة	00	21.00	11.10	6.60	2.40	81.60	45.90
L.S.Dعند مستوى احتمال 0.05	*1.738	*0.399	*0.276	*0.260	*0.234	*0.262	*0.210

(*) تمثل وجود فروق معنويه بين المعاملات _ كل رقم بالجدول يمثل معدل لثلاث مكررات

المصادر:

1 FAO, 1999. Production year book. Vol. 53. Farr, D. C., G. F. Bills. G. P. Chamuris, A. Y. Rossman, 1989, Fungi on plants and plant products in the United States. APS PRESS. ST PAUL. MN. 1251PP.

2 منظمة الاغذية والزراعة العالمية 2007 بالتعاون مع مشروع GCP/SYR/006/IJA.

3 اغا ، جواد ذنون وداود عبد داؤد . 1991. انتاج الفاكهة المستديمة الخضرة ، الجزء الثاني . دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل .

4 غالي ، فائز صاحب غالي . 1980. تدهور الحمضيات المتسبب عن الفطر *Phytophthora citrophthora* (R.E. Sn. and E.H. Sm.) وعلاقتة بمستوى الماء الارضي. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد.

5 جبر،كامل سلمان ،2006.اول تسجيل للفطري *Rhizoctonia solani* و*Scytalididum sp.*المسببين لمرض تعفن جذوروقواعد سيقان نباتات الجربرا في العراق.مجلة العلوم الزراعية 37 : 133-140 .

6 حسون ، إبراهيم خليل . 2005 . المكافحة البايلوجية والكيميائية لمسبب تقرح ساق البطاطا *Rhizoctonia solani* Kuhn أطروحة دكتوراة . كلية الزراعة . جامعة بغداد.

7 Rai , V.R. and T. Mamatha . 2005. Seedling diseases of some important forest tree species and their management . http: //www. Metla. F : / julkaisut / working papers / 2005 / m WPo11.htm.

8 Kloepper , J.W; C.M. Ryu and S. Zhang . 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94 : 1259-1266.

9 Hillel, D. 2005. Plant Growth Promoting Bacteria. Elsevier, Oxford, U. K.,:103-115.

10 Pathak, V. N. (1974) . Laboratory manual of plant pathology . Oxford and IBH Publishing Co. NewDelhi , India . 212pp.

11 Booth ,C;1971.The Genus *Fusarium* . Commonwealth Mycological Institute , Kew , Surrey , England,237 pp.

12 Parmeter , J. R. and H. S. Whitney. (1970). Taxonomy and nomencleature of the imperfect stage In: *Rhizoctonia solani* Biology and pathology. Parmeter, J. R. Univ. of California . 7–19.

13 Ellis, M.B. (1971). Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute Kew , survey England .608 pp.

14 Al-Hardan , D. 1966. Observation trials on citrus wilting in Kanaqin. FAO. Appendix . IV. Cario.

15 Dewan , M.M; 1989. Identity and frequency of fungi in root of wheat and Ryegrass and their effect on take all and host growth . Ph. D. Thesis , Univ. , Wes. Australian 210 pp.

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

17 خضير،وديجة محسن 2007.المكافحة المتكاملة لمرض تعفن جذور الحمضيات المتسبب عن الفطر *Fusarium solani* اطروحة دكتوراة .كلية الزراعة .جامعة بغداد .

18 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 control of *Rhizoctonia solani* in tomato.J. Biotec.6:115- 127.

19 Larkin , R.P. 2004. Development of integrated biological and cultural approaches for control of powdery scab and other borne disease. USDA , ARS, New England Plant , Soil, and water lab University of Maine , Orone , ME. 044469 www-Maine potatos. Com / pdf. / potresgrant-04.

20 Mckinney , H.H; 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosprium sativum* .J.Agric. Res.26:195-217.

21 Booth , C; 1977. *Fusarium* . Laboratory guide to the identification of the major species . Commonwealth Mycological Institute , Kew, Survey , England , 58 pp.

22 Tatum , J.H. and R.A. Baker. 1983. Naphthoquinones produced by *Fusarium solani* isolated from citrus. Phytochemistry 22 : 543-547.

23 Barreto , D; S. Babbitt , M. Gally and B.A. Perez . 2003. *Nectria haematococca* Cansing Root Rot Ra in Olive Greenhouse Plants. Revista de la Soiciedad Argentina de Horticultura , 32 (1) : 49-55.

24 Lozovaya , V.V., A.V. Lygin , O.V. Zernova , S., Li , J.M. Widholm and G.L. Hartman . 2006. Lignin degradation by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. Plant Dis. 9 : 77-82.

25 Singh, T. 1977. Studies on interaction between *Azotobacter chroococcum* and some plant pathogens. IAP, Ph. D. Thesis . Cited from Can. J. Microb. , New Delhi).

26 Usharani, T.R. and T.K. Gowda .2011. Cloning of chitinase gene from *Bacillus thuringiensis* . Ind. J. Biotechnology 10:264-269.