Phenotypic and molecular diagnosis of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and the effect of temperature under light and dark conditions on the sclerotia development.

التشخيص المظهري والجزيئي للفطر *Sclerotinia sclerotiorum* وتأثير درجات الحرارة تحت الأضاءة والظلام في تطور الاجسام الحجرية

بان طه محمد نادية نايف حسين*
قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء
* بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

المستخلص:

تم تشخيص الفطر *Sclerotinia sclerotiorum (lib.) de Bary* بالاعتماد على الصفات المظهرية والمجهرية ، وجزيئيا باستخدام تقانة Polymerase chain reaction (PCR) ، باستخدام البادئ 18S rRNA gene . تضمنت الدراسة عزل وتشخيص الفطر واكثاره باستخدام وسط حبوب الحنطة Wheat grain media لغرض الحصول على اكبر كمية ممكنة من الاجسام الحجرية. كما تم دراسة تأثير بعض الظروف البيئية من درجات الحرارة ، والاضاءة ، والظلام في انتاج الاجسام الثمرية Apothecium ، والاكياس البوغية Ascus، والابواغ الكيسية Ascospores من الاجسام الحجرية. اوضحت النتائج ، ان البادئ المستخدم نجح في تشخيص الفطر، كما أثرت العوامل البيئية المتمثلة بدرجات الحرارة 10،15،20،25 ^{0}م والإضاءة أو عدمها .في أنتاج السويقات Stipes والأجسام الثمرية Apothecium من الجسم الحجري، فكانت درجات الحرارة 10 و15 و20 ^{0}م مناسبة لإنتاج الاجسام الثمرية شرط توفر الاضاءة والا فان الاجسام الثمرية لم يكتمل نموها وتبقى بشكل سويق stipe يستطيل في ظروف الظلام ،اما درجة الحرارة 25 ^{0}م لم تنتج اجساما ثمرية حتى بوجود الاضاءة ولم يحصل تطور للسويقات عند هذه الدرجة . يعتبر الماء المقطر المعقم أفضل الأوساط البيئية الملائمة لتطور الأجسام الحجرية وتكوين السويقات شرط توفر درجة الحرارة الملائمة.

ABSTRACT:

The Fungus *Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary* was isolated based on morphological and microscopic characteristics and on molecular by using Polymerase chain reaction (PCR) with the Primer 18S rRNA. The isolation Propagation of the fungus using Wheat grain media was used in order to gain as much as possible from the sclerotia and using these sclerotia in the next experiments . The environment condition ie. temperature ,light,and darkness effects on the production of Apothecium ,Ascus and Ascospores produced from the sclerotia were also studied. Results revealed that the primer used in fungal diagnosis was capable to do that in the Fungus ،and 25 c^0 and light effect on the stipes and Apothecium production from sclerotia were effective temperature at 10,15 and 20 c^0 with the presence of light were suitable for Apothecium production .Without light , Apothecium stays without growth completion and remains on stipe elongates under the dark condition. Distilled water is considered the best medium for sclerotia formation and development of stipes.

المقدمة :

الفطر *Sclerotinia sclerotiorum (lib.) de bary* من فطريات التربة الممرضة للنبات والمنتجة للأجسام الحجرية Sclerotia (1). تعد الأجسام الحجرية وسيلة فعالة في بقاء الفطر لسنوات عديدة قد تصل إلى ثمان سنوات بظروف المختبر (2)، وتكون مقاومة للحرارة والجفاف والمبيدات الفطرية، ويمكن أن تبقى في التربة لسنوات عديدة قد تصل إلى أكثر من عشر سنوات(3). كما تتحمل مديات حرارية عالية قد تصل إلى 121^{0}م (4) ، كما يمكن أن تبقى في التربة لعدة سنوات بوجود مياه الري والمناخ الدافئ (5)و(6). يسبب الفطر العديد من الأمراض على مدى واسع من المحاصيل الحقلية والفاكهة ونباتات الزينة والأشجار والشجيرات والأعشاب الضارة (7)و(8)، ويحدث مرض العفن الأبيض Whit Mould أما بالإنبات الجنسي للأجسام الحجرية Carpogenically لإنتاج الأجسام الثمرية Apothecium التي تطلق الأبواغ الكيسية Ascospores في الهواء والتي بإمكانها إصابة أجزاء النبات فوق سطح التربة (9)، وتعد الأبواغ الكيسية هي مصدر الإصابة الأولية(10)، أو بالنمو الخضري Myceliogenically ،حيث تتطور الأجسام الحجرية إلى خيوط فطرية تستطيع مهاجمة أنسجة النبات العائل مباشرة تحت سطح

التربة ،وبإمكان هذا الفطر أن يغزو المحاصيل النباتية في الحقل أو المحاصيل المخزنة بعد الحصاد (11). وجد (12) ، أن وسط البطاطا دكستروز اكار(PDA) والـ pH 5.0 ودرجة حرارة 20- 25^{0}م مناسبة للنمو الخضري للفطر. يلعب نوع الوسط الزرعي والـ pH مع درجة الحرارة دورا في النمو الخضري، بينما درجة الحرارة10-20 ^{0}م هي المناسبة للإنبات الجنسي للأجسام الحجرية (13)، بينما سجلت درجة الحرارة 4^{0}م الدرجة المثلى للإنبات الجنسي تحت ظروف المختبر(14) .تبين أن هناك علاقة وثيقة بين درجة الحرارة والرطوبة في الإنبات الجنسي للأجسام الحجرية (15) ،كما وإن قدرة الأبواغ الكيسية في البقاء حية لمدة 21 أسبوعا في درجات حرارة 5-10 ^{0}م ورطوبة نسبية أكثر من 80% في المختبر، وتنخفض تلك القدرة بإرتفاع درجات الحرارة ، ووجد إن إنطلاق الأبواغ الكيسية ascospores من *S.sclerotiorum* لا يقتصر على فترات الظلام أو الضوء المستمر أو بالتناوب (16).ان حدوث ظاهرة "النفخ" او السحابة puffing للأبواغ الكيسية ascospores تحدث نتيجة للتغير المفاجئ للظروف البيئية مثل الإضاءة بعد الظلام أو انخفاض في الرطوبة أو الحرارة أو نتيجة لإزالة غطاء الطبق الحاوي على الأجسام الثمرية Apothecium للفطر *Sclerotinia sclerotiorum*، (17) و (18). اثبتت الدراسات ومنها (19)، ان الانواع التابعة لجنس *S. sclerotiorum* متقاربة من حيث الشكل المظهري ويمكن ان نميز بينها بإستخدام صفات تشخيصية دقيقة أو عن طريق تحليل المادة الوراثية الـ DNA لذا إتجهت الدراسات في الآونة الاخيرة على التشخيص الجزيئي ، والذي يستند الى تقنية(Polymerase Chain reaction (PCR و التي تتميز بسرعتها في اعطاء النتائج و دقتها المتناهية في التشخيص(20)و(21). فهدفت الدراسة إلى:

1- التأكد من تشخيص الفطر*S.sclerotiorum* مظهريا وجزيئيا بإستخدام تقانة الـPCR.
2- تنمية الأجسام الحجرية على وسط الحنطة لإنتاج أكبر عدد ممكن من الأجسام الحجرية .
3- دراسة تكون السويقات والاجسام الثمرية والأبواغ الكيسية للفطر تحت درجات حرارية مختلفة وبظروف الاضاءة المستمرة او الظلام المستمر.

المواد وطرائق العمل Material and methods:

اولا- الأوساط الزرعية المستعملة:-

1- وسط البطاطا سكروز اكار Potato sucrose Agar (PSA) .
2- وسط البطاطا دكستروز اكار الجاهز : Potato dextrose Agar (PDA).
3- وسط حبوب الحنطة Wheat grain media .
4- وسط الماء المقطر المعقم.

ثانيا - الصبغات والمحاليل المستعملة:

1- صبغة اللاكتوفينول أزرق المثلين Lactophenol cotton blue stain:
حضرت وفقا الى (22) من المواد التالية:
المثلين الأزرق 0.05 غم ، بلورات الفينول 20 غم ، كليسيرول 40 مل ، حامض اللاكتيك 20مل و ماء مقطر20 مل، واستخدمت لتصبيغ الفطر وتثبيته لغرض الفحص المجهري .
2- محلول هيدروكسيد الصوديومNaOH Solution
تم تحضيره من إذابة 8غم من هيدروكسيد الصوديوم في 100 مل ماء مقطر ، وأستخدم لمعايرة الأس الهيدروجيني في الوسط الزرعي.
3- محلول حامض الهيدروكلوريك HCl 10عياري:
حضر هذا المحلول حسب التعليمات الخاصة بالشركة المصنعة واستخدم لغرض تعديل الأس الهيدروجيني للأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة.

ثالثا- جمع العينات Samples collection :

جمعت سيقان نباتات الباذنجان المصابة من المزارع القريبة من الكلية التقنية المسيب وأخذت منها الأجسام الحجرية واستنادا إلى الأعراض المظهرية والتشخيص الأولي ،شخص الفطر مظهريا استنادا الى ما ورد في (7و23و24) ووجد إنه يعود إلى نفس النوع الذي تم دراسته وتشخيصه جزيئيا من قبل (21). تم زراعة الأجسام الحجرية للفطر على وسط PSA بعد غسلها بالماء العادي و تعقيمها سطحيا لمدة ثلاث دقائق بمحلول الكلوراكس التجاري 0.06%، وغسلها عدة مرات بالماء المقطر المعقم ، وتجفيفها على أوراق ترشيح معقمة .

رابعا- انتاج الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* :

زرع جسم حجري واحد في وسط طبق بتري حاوي على PSA المضاف اليه الكلورامفينيكول250 ملغم/لتر وبعد خمسة أيام من الحضن وقبل أن يكون الأجسام الحجرية ،تم تقسيم الطبق إلى قطع مكعبة ،وذلك لغرض إكثار الفطر على وسط الحنطة لإنتاج أكبر عدد ممكن من الأجسام الحجرية (14).

خامسا- تشخيص الفطر *S. sclerotiorum*:

1-التشخيص المظهري للفطر:

شخص الفطر وفقا لما اورده (7و23و24)، وبإستخدام طريقة زراعة جسم حجري واحد في وسط طبق بتري يحوي على PDA المضاف اليه الكلورامفينيكول 250ملغم/لتر. وبعد الحضن لمدة 5 ايام بدرجة حرارة 20± 2 مْ لوحظ الغزل الفطري الأبيض وبعدها تكونت الأجسام الحجرية .تم تحضير شرائح زجاجية من الغزل الفطري وصبغت بصبغة اللاكتوفينول وثم وضع غطاء الشريحة Coverslips ،فحصت تحت المجهر لملاحظة الغزول الفطرية العقيمة وتأكيد التشخيص .

2-التشخيص بإستخدام فحص PCR:

تمت تنمية الفطر على وسط الPDA من خلال زراعة جسم حجري واحد في مركز الطبق في درجة 20 مْ لمدة إسبوع في الحاضنة وحسب طريقة (25 و26 و27).

تم إجراء فحص PCR للتأكد من إن الفطر هو *S. sclerotiorum* وذلك بإستخدام البادئ primer الخاص بجين 18S rRNA gene ITS region المسؤول عن تشخيص الفطر*S. Sclerotiorum*.حيث تم تصميم هذا البادئ من خلال موقع بنك الجينات Genbank NCBI وبإستخدام برنامج Primer3plus لتصميم البادئات والخاصة بفحص ال PCR وتم تجهيز البادئ من قبل شركة Bioneer :

الجدول 1: يمثل البادئ المستخدم مع تسلسله النيوكليوتيدي وناتج فحص PCR

Primer	Sequence		Amplicon
18S rRNA gene	F	GTAGGTGAACTGCGGAAGGA	399bp
	R	GCCGCCACTGATTTTAGAGC	

Sclerotinia sclerotiorum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: SfGa-107 Gen Bank: AB937099.1

وتكون الفحص من عدة خطوات:

اولا: استخلاص الحامض النووي من الفطر Fungus DNA extraction :

تم استخلاص الحامض النووي من الفطر وذلك باستخدام عدة ال EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA (Mini-Preps Kit) ،

الجدول 2: العِّدد التي استخدمت مع اسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ.

ت	اسم العدة	مكوناته	بلد المنشأ
1	عدة استخلاص الحامض النووي الفطري EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Mini-Preps Kit	EZ-10 Column 50	Biobasic Canada
		ml Collection Tube 50 2.0	
		Universal Digestion Buffer 12 ml	
		Universal Buffer PF 6 ml	
		Universal Buffer BD 12 ml	
		Universal PW Solution (concentrate) 18 ml	
		Universal Wash Solution (concentrate) 7.5 ml	
		TE Buffer 10 ml	
		Proteinase K (10mg/ml) 1.2 ml	
2	عدة فحص Accupower ® PCR PerMIX	TopDNA polymerase	Bioneer (Korea)
		(dNTP (dATP, dCTP, dGTP, Dttp)	
		Tris-HCl (pH 9.0), KCl, MgCl2	
		Stabilizer and tracking dye	

وتم إجراء الإستخلاص حسب تعليمات الشركة كآلاتي:

1- نقل 200مليغرام من مستعمرات النمو الفطري الى حاوية خزفية معقمة وباستخدام النايتروجين السائل ذو درجة حرارة C^0 -69 تم سحق المستعمرات الفطرية ومن ثم نقلت الى انابيب معقمة سعة 1.5 ml .

2- اضيف 180µl من محلول Universal Digestion Buffer و20µl من انزيم Proteinase K الى كل عينة وثم مزجت بوساطة جهاز المازج ومن ثم حضنت العينات بدرجة حرارة $56C^0$ لمدة 30 دقيقة.

3- اضيف 100 µlمن محلول Universal Buffer PF ومزج بوساطة قلب الانابيب حضنت بدرجة حرارة C^0 – 20 لمدة 30 دقيقة.

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

5- اضيف 100 µlمحلولUniversal Buffer BD ومزجت بوساطة المازج.

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

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

8- اضيف 500µlمن محلول Universal PW Solution ومن ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقة ومن ثم تم التخلص من الراسب.

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

10- وضعت ال EZ-10 column الحاوية على الحامض النووي في انابيب معقمة سعة 1.5 ml ومن ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 rpm لمدة دقيقتان لتجفيف ال EZ-10 column membrane من الكحول ومن ثم تم التخلص من الراسب.

11 - اضيف 50µl من محلول ال TE Buffer لإذابة الحامض النووي داخل ال EZ-10 filter column ومن ثم حضنت في درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة وبعدها وضعت جميع الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 rpm لمدة دقيقة لجمع الحامض النووي وبعدها نقل إلى الحفظ بدرجة حرارة -20 تحت الصفر في الثلاجة لحين الاستعمال في فحص الPCR.

ثانيا : فحص الحامض النووي المستخلص DNA profile :

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

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

2- نقوم بتصفير ركيزة المقياس مرتين باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز وذلك بوضع 1 مايكروليتر من(ddH2O) باستخدام ميكروبايبيت معقمة على سطح ركيزة المقياس وإجراء التصفير وبعها نقوم بتنظيف الركيزة لقياس العينات.

3 -نقوم بالضغط على زر ok لبدء عملية قياس تركيز ال DNA وذلك باستخدام 1 مايكروليتر من كل عينة من ال DNA المستخلص ومن ثم نقوم بتنظيف ركيزة المقياس الجهاز مرة اخرى لقياس العينة الاخرى.

4- وكذلك تم تحديد نقاوة عينات ال DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية جهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين (280/260 nm) حيث إن الحامض النووي DNA المستخلص يعتبر نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8).

ثالثا- تحضير PCR Components

تم تحضير خليط تفاعل PCR باستخدام عدة ال AccuPower® PCR PerMIX وحسب تعليمات الشركة كما في الجدول الاتي:

الجدول 3:يوضح PCR Components

PCR Components	Volume
DNA template	5µL
(Forward primer10 pmol)	1.5µL
Reverse primer (10 Pmol)	1.5µL
PCR water	12µL
Total	20µL

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

رابعا- حالات الدورات الحرارية لفحص PCR Thermocycler conditions :

تم إجراء فحص PCR بإستخدام جهاز PCR Thermocycler كما في الجدول التالي:

الجدول 4:يوضح حالات الدورات الحرارية لفحص PCR Thermocycler conditions

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

خامسا- تحليل نتائج فحص ال PCR:

تم إجراء الترحيل الكهربائي Agrose gel electrophorsis باستخدام هلام الأكروز بنسبة 1% وذلك لقراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة PCR product analysis وفقا لما أورده (28) و (29) . كما يأتي:

1- اذيب 1 غم من هلام الأكروز Agarose gel في 100 مل من محلول ال TBE buffer الدارئ بتركيز 1X وباستخدام جهاز Microwave لمدة 5 دقيقة.
2- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50 ^{0}م وبعدها تم إضافة 3 مياكروليتر من صبغة الحامض النووي المشعة Ethidium bromide ومزجت مع الهلام.
3- صب هلام الأكروز في قالب الترحيل Tray الحاوي على المشط Comb لتحديد اماكن عينات PCR، وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ومن ثم ازيل المشط من الهلام بعناية.
4 - تم عملية تحميل العينات ناتج الفحص PCR product ووضعت في حفر الهلام.
5- تم إستخدام سلم القياس DNA ladder 100 لقياس ناتج PCR product ووضع في الحفرة الأولى.
6- بعد اكتمال عملية التحميل تم غمر هلام الأكروز بإستخدام محلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1X وغلق غطاء الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل باستخدام تيار 100فولت وامبير 80 لمدة ساعة واحده.
7- بعد إنتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على ناتج PCR بإستخدام مصدر الأشعة فوق البنفسجية U.V light source لتحديد الناتج مع وحدة القياس وتم تصويرها بإستخدام كاميرا رقمية.

سادسا: تأثير الإضاءة المستمرة في إنتاج الأجسام الثمرية من الجسم الحجري للفطر *S.sclerotiorum* بدرجات حرارية مختلفة:

نفذت هذه التجربة في ظروف الإضاءة المستمرة داخل المختبر في غرفة النموGrowth chambar وبدرجات حرارية 10،15،20، 25مْ بعد تعقيم الأجسام الحجرية سطحيا بمحلول الكلوراكس التجاري 0.06% لمدة 2-3 دقائق و غسلت ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم و نشفت على ورق ترشيح معقم. تم وضع 10 جسم حجري في كل طبق بتري بقطر 9 سم يحوي 20 مل ماء مقطر معقم ، وحضنت بدرجات الحرارة الموضحة أعلاه وفي ظروف إضاءة مستمرة وبخمسة مكررات لكل معاملة ،تم مراقبة المعاملات وأخذ القراءات لغاية إنتهاء التجربة.

سابعا- تأثير الظلام المستمر في إنتاج الأجسام الثمرية من الجسم الحجري للفطر*S.sclerotiorum* بدرجات حرارية مختلفة :

أجريت بنفس طريقة سادسا اعلاه باستثناء الحضن في ظروف الظلام المستمر.

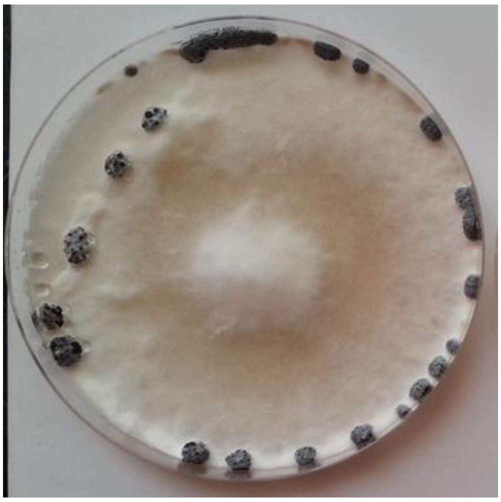
النتائج و المناقشة:

1 -تشخيص الفطر مظهريا ووراثيا:

بينت الملاحظات العامة للفطر الشكل (1) ،بدءا من جمع العينات وصولا إلى التشخيص المجهري ووفقا للمفاتيح التصنيفية بأن الفطر هو *S. sclerotiorum* (24) و(23)و(7).

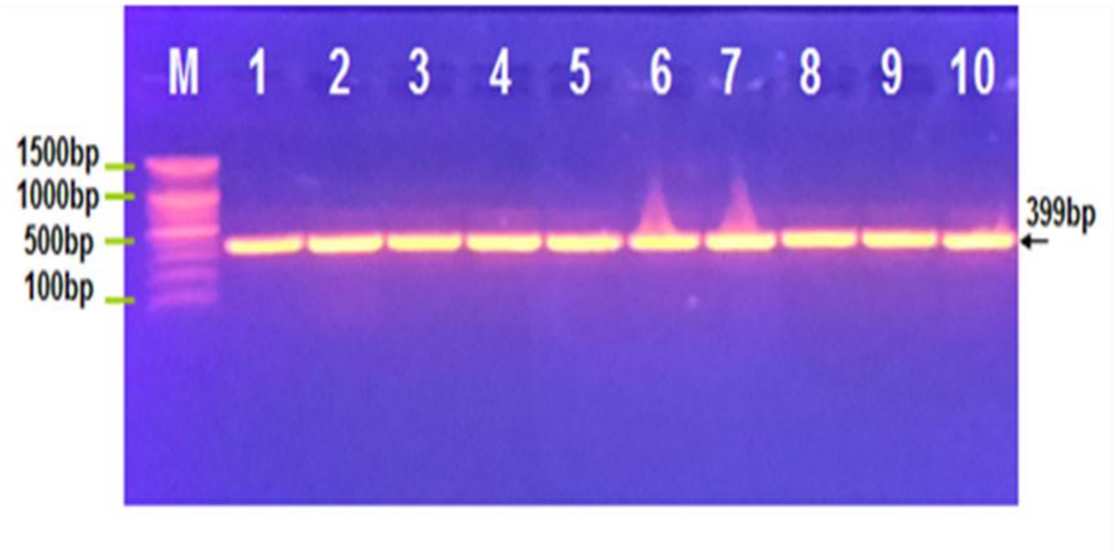
الشكل 1:نبات الباذنجان وعليه الغزل الفطري والجسم الحجري للفطر *S.sclerotiorum*

أظهرت النتائج في الشكل 2 ،ان الغزل الفطري غطى الطبق بالكامل بعد خمسة أيام من التلقيح على شكل خيوط بيضاء ،وبدأ بإنتاج الاجسام الحجرية Sclerotiaعلى وسط PDA بعد إسبوع من التلقيح واختلفت اعداد واحجام الاجسام الحجرية و نمط توزيعها في الاطباق المختلفة وهذه النتيجة توافق مع ما توصل اليه (14)، وامتازت الاجسام المنتجة على الوسط PDA بانها ذات أشكال غير منتظمة فبعضها كروي وبعضها متطاول ومقعرة من السطح الداخلي واحيانا ملتصقة مع بعضها، واختلفت عن الاجسام الحجرية المتكونة على العائل، بكون الاخيرة لا تكون مقعرة، فضلاً عن لونها الأسود و صلابة قشرتها الخارجية، وهذه النتائج مشابهه لما توصل إليه (30) ،إذ بين إن اللون الأسود الصلب للجسم الحجري هو الطبقة الاولى من الجسم التي تحتوي على خلايا سميكة منتجة لصبغة الميلانين Melanin ، وتلعب دورا في عملية حماية الفطر *S. sclerotiorum* ،أما الطبقات الأخرى فلا تكون صلبة لعدم إحتوائها على الصبغة. اما التذبذب في انتاج الاجسام الحجرية على الوسط الزرعيPDA على الرغم من كونها محضنة في درجة حرارة تراوحت بين 20± 2 ضمن حدود المدى الحراري المناسب الذي ذكره (31) في نتائجه ، وهذا يتفق مع ما ذكره (12) ،إذ بينا أن نمو الفطر يكون بأعلى معدلاته عن درجة الحرارة 20-25 ^{0}م على وسط الـ PDA ،اما إنتاجه للأجسام الحجرية فيكون في المدى 15-20 ^{0}م وهذا قد يرجع إلى ظروف تجريبية ووراثية .كما تم ملاحظة مراحل تكوين الأجسام الحجرية الثلاثة والتي بدأت بتجمع الغزل الفطري على شكل كتل بيضاء ما تلبث ان تتحول إلى اللون البني ومن ثم إلى اللون الأسود مع خروج افرازات عديمة اللون اختفت عند نضج الاجسام الحجرية، وتتفق هذه النتائج (32).



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

وبعد التشخيص المظهري والتأكد من إنه الفطر *S. sclerotiorum* تم التشخيص الجزيئي وتبين إن هذه العزلة مشابهة للعزلة التي عزلها(21) ومتوافقة لما ذكره (33) على الرغم من إستخدام القطعة الجينية المتمثلة 18S r RNA gene . كما في الشكل 3.



الشكل3: صورة الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الأكروز والذي يظهر نتائج فحص الـ PCR لجين S rRNA gene , ITS1 18region والخاص بتشخيص فطر *Sclerotinia sclerotiorum* . حيث يمثل(M: Marker 1500-100bp)، الحفر من (1-10) عزلات الفطر الموجبة للفحص بناتج 399bp.

2 – تأثير الإضاءة المستمرة في إنتاج الأجسام الثمرية من الجسم الحجري بدرجات حرارية مختلفة :

أظهرت النتائج في الجدول 5 ، إن بداية إنتاج الأجسام الثمرية بدأ في الأسبوع الثالث في كل من الدرجات الحرارية من 10 - 20^0 م واستمر تطوير السويقات مع زيادة طول الفترة الزمنية للحضن من الأسبوع السابع حيث ظهرت بداية تكوين الأقماع Apothecium وأكتمل نموها في الأسبوع الثامن من الحضن تحت ظروف الإضاءة المستمرة ، بينما لم تسجل درجة حرارة 25 ^{0}م أي تطور في الجسم الثمري للفطر . مما يدل على إن درجات الحرارة من 10-20 ^{0} م مناسبة لتطوير الأجسام الثمرية ،وهذه النتيجة متوافقة مع ما توصل إليه (14) ، في أن درجات الحرارة المنخفضة مناسبة لإنبات الجسم الحجري وتكوين الأجسام الثمرية بشرط توفر الاضاءة . وبين (34) ،أن السويقات تطورت إلى شكل يشبه القمع أو الكوب يدعىapothecium أو الجسم الثمري وكانت الأقماع بنية اللون محمولة على حامل او سويق stipe بطول5- 21 ملم في، حين سجل قطر أقراصها 2-9 ملم كما في الشكل 4 .

الجدول 5: يوضح تطور وتكوين الجسم الثمري في درجات حرارة مختلفة وتحت ظروف الإضاءة المستمرة بالماء المقطر المعقم.

درجات الحرارة م^0 / الأسبوع	10	15	20	25
الاول	0	0	0	0
الثاني	0	0	0	0
الثالث	ظهور نتوء من سطح الجسم الحجري	ظهور نتوء من سطح الجسم الحجري	ظهور نتوء من سطح الجسم الحجري	0
الرابع	بداية تكون السويقات	بداية تكون السويقات	بداية تكون السويقات	0
الخامس	تكون السويقات	تكون السويقات	تكون السويقات	0
السادس	استطالة السويقات بصورة قصيرة	استطالة السويقات بصورة قصيرة	استطالة السويقات بصورة قصيرة	0
السابع	إستمرار استطالة السويقات وبداية تكوين القمع	إستمرار استطالة السويقات وبداية تكوين القمع	إستمرار استطالة السويقات وبداية تكوين القمع	0
الثامن	تكون الجسم الثمري من الجسم الحجري	تكون الجسم الثمري من الجسم الحجري	تكون الجسم الثمري من الجسم الحجري	0

ان الأجسام الحجرية المختلفة في الطول والعرض كونت أجساما ثمرية إختلفت في عددها وكما سيناقش لاحقا ، فكلما كان كبير كان عدد الأجسام الثمرية المتكونة أكثر وذلك لكثرة المواد الغذائية المخزونة في الجسم الحجري الكبير، وأشار (13) ، أن درجة الحرارة المناسبة للإنبات الجنسي للفطر *S. sclerotiorum* تكون في الغالب بين 10- 20 ^{0}م ، إلا إن درجات الحرارة إختلفت بين الدراسات المختبرية .واوضح (24)، إن إنبات الجسم الثمري عادة ما يتطلب أجسام حجرية تكون رطبة لمدة أسبوع أو أسبوعين قبل الإنبات وتحصل في أعماق التربة تصل إلى 2 سم، ويمكن لجسم ثمري واحد او اكثر أن يمتد من الجسم الحجري للوصول إلى سطح التربة. كما أكد (9) أن تكوين الجسم الثمري يتطلب الرطوبة للإنبات والعدوى . ان العواملِ البيئيةِ المتمثلة بدرجة حرارة التربةِ ، رطوبة التربةِ والضوء تؤثر على تكوين الجسم الثمري للفطر (35) *S.sclerotiorum* ، ويعد الضوء عامل بيئي مهم له تأثيرا على تطور الجسم الحجري وتكوين السويقات والأجسام الثمرية للفطر *S. sclerotiorum* وبين (36) ان للضوء تأثيرا على الفترة اللازمة لظهور السويقات المتكونة من الجسم الحجري، وانه تظهر بعد 3 أسابيع بوجود الضوء وبعد 10أسابيع بلغ عددها 65.5 سويق لكل 10 أجسام حجرية و كانت Apothecia دائرية و بقطر 2-9 ملم .

الشكل 4: تظهر الاجسام الحجرية وبأحجامها المختلفة بعد ثمانية اسابيع من الحضن بالماء المقطر المعقم بدرجة حرارة 10- 20 ^{0}م واضاءة مستمرة منتجة للأجسام الثمرية المكونة من السويق Stipe والجسم الثمري Apothecium.

3 – تأثير الظلام المستمر في إنتاج الأجسام الثمرية من الجسم الحجري بدرجات حرارية مختلفة :

اتضح من الجدول 6 ،أن ظروف الظلام المستمر في الماء المقطر المعقم كان سببا في ظهور بدايات السويقات من الجسم الحجري عند درجات حرارية 15و20 ^{0}م واستمرت السويقات في الاستطالة ، ولم تظهر الأقماع مطلقا حتى الأسبوع الثامن وهو نهاية التجربة كما في الشكل 5 ،بينما لم تظهر السويقات مطلقا في درجة حرارة 25 ^{0}م، وهذه النتيجة مشابهة لما توصل إليه (37) و (14) في أن السويقات تظهر في الجسم الحجري وتستمر بالإستطاله في ظروف الظلام المستمر ، ولم تظهر السويقات في درجات الحرارة 30-50 ^{0}م سواء في ظروف الأضاءة المستمرة أو الظلام المستمر. وهذه النتائج تتفق مع (38)،إذ بين ان السويقات تستمر بالإستطاله في الظلام وعند تعرض السويقات للضوء تتكون الأجسام الثمرية ، بينما ذكر(36) أنه في ظروف الظلام في درجات حرارة 5-20 ^{0} م ظهرت السويقات بعد 12إسبوعيا وكان عددها 107 لكل 10 أجسام حجرية بعد 20 إسبوعيا من الحضانة. ولدرجة الحرارة تأثيرا على عدد وطول السويقات و إن المدى الحراري الأفضل يقع بين 10-20 ^{0} م في حين بين(39)، إن هذا المدى الحراري يقع بين10-25 ^{0} م وقد يعود هذا الاختلاف إلى نوع السلالة المستخدمة في الدراسة. وكذلك مشابهة لما ورد في(33) .ومن حيث تأثير الضوء فقد بين(40)،أن السويقات الناتجة من الأجسام الحجرية للفطر*S.sclerotiorum* لا تتطور إلى أجسام ثمرية إلا بوجود الضوء . هذه النتائج تتفق مع (14)حيث أوضحت إن للضوء تأثيرا كبيرا على إنبات الأجسام الحجرية وتكوين الأجسام الثمرية فلم يظهر أي إنبات جنسي في ظروف الظلام في أي من درجات الحرارة التي تتراوح بين5-50 ^{0} م لكن ظهر إنبات جنسي بين درجات الحرارة من 5-20 ^{0} م في ظروف الإضاءة المستمرة فقط بشده 650 لوكس. كما ذكر(41) ، إنهما لم يتمكنا من الحصول على أي جسم ثمري عند أختبار 200عزلة من الفطر*S.sclerotiorum* في الظلام الكامل. وأشار(42) إلى أنهما لم يحصلا إلا على جسم ثمري واحد من 1000سويق يعود للفطر *S.sclerotiorum* محضن في ظروف الظلام المستمر. اما نوع الوسط الملائم للانبات الجنسي فاتفقت النتائج مع (43)إذ بين إن أفضل الأوساط البيئية الملائمة لتطور الأجسام الحجرية وتكوين السويقات هو الماء المقطر.

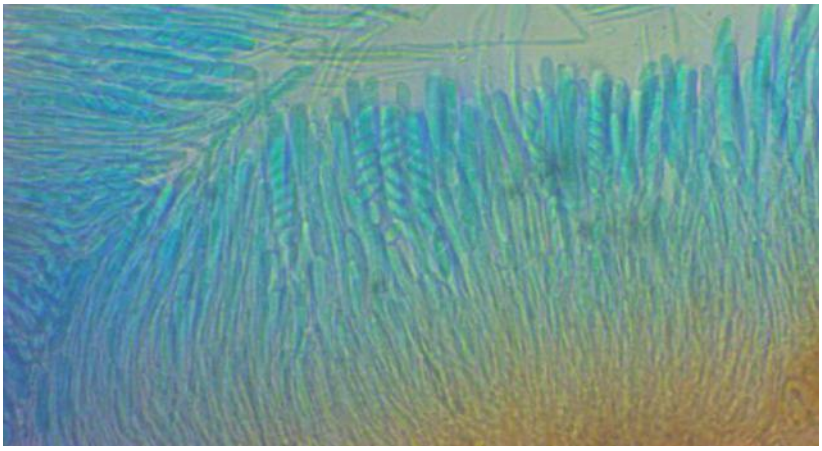
الجدول 6 : يوضح تطور السويقات في درجات حرارة مختلفة وتحت ظروف الظلام المستمر بالماء المقطر المعقم.

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

الشكل5:تظهر الاجسام الحجرية وبأحجامها المختلفة بعد ثمانية اسابيع من الحضن بالماء المقطر المعقم بدرجة حرارة 10- 20 ^{0} م واضاءة مستمرة منتجة للسويقات Stipes فقط.

من خلال تحضير شريحة من جزء صغير من الجسم الثمري وتصبيغ الجسم الثمري بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء وفحصة تحت المجهر، وجد انه يتكون من الأكياس البوغية التي تكون شفافة وأسطوانية الشكل والأبواغ الكيسية ضمن الطبقة الخصيبة مع خيوط عقيمة بين الاكياس، وتحتوي الأكياس البوغية على ثمانية أبواغ كيسية بيضوية الشكل مرتبة بشكل اهليليجي الشكل 6. وهي بذلك بنفس الوصف الذي وصفه كلا من(44) بأن الطور الجنسي للفطر يتكون من الأبواغ الكيسية Ascospore التي توجد داخل أكياس Asci وتنشأ هذه الأكياس في أجسام ثمرية كأسية الشكل Apothecia محمولة على سويق Stipe ينشأ من نسيج حشوي فطري Stromata ، كما تم مشاهدة انطلاق الأبواغ الكيسية من الجسم الثمري بعد فتح غطاء الطبق على شكل يشبه الدخان المتصاعد او السحابة او ما تسمى بظاهرة النفخ Buffing ، وقد توافقت هذه النتائج مع (17)إذ لاحظ إنطلاق الابواغ الكيسية في الهواء المشبع وأن هنالك إطلاق منتظم مستمر للـascospores في النوع *S. trifoliorum* في الهواء المشبع، إن

إطلاق البوغ من قبل الجسم الثمري من *S. sclerotiorum* بسهولة عن طريق إزالة الغطاء من الطبق المغلق الذي يحتوي على apothecia في بيئة مشبعة ويرجع هذا الإنطلاق إلى الانخفاض المفاجئ في نسبة الرطوبة و الضغط .



الشكل 6: يظهر الاكياس البوغية و الابواغ الكيسية مع الشعيرات العقيمة بعد ثمانية اسابيع من الحضن في الماء المقطر المعقم بدرجة حرارة 10- 20 ^{0}م واضاءة مستمرة .

المصادر:-

1- Adams,P.B.andAyers,W.A. (1979) . Ecology of *Sclerotinia* species . Phytopathology . 69:896-899.

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

3- Melo, I. S. ;Moretini, A. ; Cassiolato, A. M. R. & Faull, J. L. (2011). Development of mutants of Coniothyrium minitans improved efficiency for control of *Sclerotinia sclerotiorum*, Journal of Plant Protection Research, 51(2):179 – 183.

4- Lanoiselet, T. L. H. ; Lanoiselet, V. M. , Lewington, F. K. , Ash, G. J. and Murray, G. M. (2005). Survival of *Sclerotinia sclerotiorum* under fire, Australasian Plant Pathology,34: 311–317.

5- Quentin,U.(2004).*Sclerotinia sclerotiorum*, occurrence and control. Kartoffelbau 8:318–319.

6- Rollins JA and Dickman MB (2001). pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum* : identification of a pacC/RIM1 homolog Appl. Environ. Microbiol. 67: 75-81.

7- 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.

8- Garg, H. ; Li H., ; Sivasithamparam, K. ; Kuo, J.and. Barbetti, M. J.,(2010) . The infection processes of *Sclerotinia sclerotiorum* in cotyledon tissue of aresistant and a susceptible genotype of Brassica napus,Annals of Botany(106):897–908.

9- Bardin, S. D. and H. C. Huang. (2001). Res-earch on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. Can J. Plant Pathol. 23(1):88–98.

10-Roseann, H. L., L. M. Winton . (2006). Diff-erential production of sclerotia by isolates of Sclerotinia sclerotiorum from Alaska Vol.28.

11-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.

12-Cuong, D. C. and Dohroo, N. P. (2006). Morphological, cultural and Physiological studies on *Sclerotinia sclerotiorum* causing stalk Rot of Cauliflower. Omonrice.14:71– 77.

13-Mila, A. L., and X.B. Yang.(2008). Effects of fluctuating soil temperature and water potential on sclerotia germination and apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Dis. 92:78-82.

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

15-Sun, P., and X. B. Yang. (2000). Light, temp-erature, and moisture effectson apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum.*Plant Dis. 84:1287-1293.

16-Clarkson, J. P.; J. Staveley ; K. Phelps ;C.S. Young and J. M. Whipps. (2003). Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. Mycol. Res. 107: 213–222.

17-Raynal, G. (1990). [Kinetics of the ascospore production of *Sclerotinia trifoliorum* (Eriks) in growth chamber and under natural climaticconditions – practical and epidemiologic incidence.] Agronomie 10:561–572. [In French].

18-Ingold, C. T. (1971) Fungal Spores: their liberation and dispersal.Oxford University Press, London,302p.

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

20-Noonan, M. P. ; Glare, T. R. , Harvey, I.C. and Sands, D. C. (1996). Genetic comparison of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from new zealand and USA, Environmental Weeds andPests,49: 126-131.

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

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

23-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.

24-Kohn,L.M. (1979). Delimitation of the econ-omically important pathogenic *Sclerotinia* species.Phytopathology 69:881-886.

25-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.

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

27-Grabicoski, Edilaine Mauricia Gelinski, David de Souza Jaccoud Filho, Marcos Pileggi, Luciane Henneberg, Marcelo LuizCunha Pierre , Cláudio Mauricio Vrisma ,AudreiNisio Gebieluca Dabul,(2015). Rapid PCR-based assay for *Sclerotinia sclerotiorum* detectiononsoybean seeds. Scag agric. (Piracicaba, Braz.) 72(1):PiracicabaJan./Feb.

28-Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

29-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.

30-Michael, J. B. ; Gardiner,R. B. & Day, A. W.(2009). Melanin Synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum* ,Mycologia, 101(3): 296– 304.

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

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

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

34-Willetts, H. J. & Wong, J. A. L.(1980).The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, S. trifoliorum, and S.minor with emphasis on specific nomenclature, The Botanical Review,46:101-165.

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

36-Letham,D.B.,(1975).Stimulation by light of apothecial initials development of *Sclerotinia sclerotiorum* .Trans.Br.Mycol.Soc.65:333-335.

37- محمد، بان طه (2003). تأثير نوعيات مختلفة من المياه في بعض صفات النمو للأجسام الحجرية للفطر *Sclerotinia Sclerotiorum (Lib.) De Bary* المجلد 1 ،العدد4 :137-142 .

38-Henderson,R.M.(1962).An inhibitory growth correlation in the apothecial stipe of *Sclerotinia sclerotiorum* .Nature 195:826.

39-Abawi, G. S. and Grogan, R. G. (1975). Source of primary inoculum andeffectsof temperatureand moisture on infectionof beans by *Whetzelinia sclerotiorum*.Phytopathology 65 : 300-309.

40-Honda,Y.& T.Yonoki.(1977).Control of *Sclerotina* disease of greenhouse eggplant and cucumber by inhibition of development of apothecia .Plant dis.Rept.61:1036-1040.

41-Kosasih ,D.& H.J. Willetts .(1975).Types of abnormal apothecia produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. Mycologia 67:89-97.

42-Henson,L.&W.D.Valleau.(1940).The production of apothecia of *Sclerotinia sclerotioeum* and Sclerotinia trifoliorum inculturephytopatholgy 30:869-873.

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

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