Evaluation of using some biological control factors of control seeds rot damping-off disease on Okra plant caused by *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* fungi

تقييم استخدام بعض عوامل المقاومة الإحيائية في مكافحة مرض تعفن البذور و موت البادرات المتسبب عن الفطرين *Rhizoctonia solani* و *Fusarium solani* على محصول الباميا.

انتصار مرزوك حسين الحسناوي
جامعة الفرات الأوسط التقنية /المعهد التقني / بابل
Email:entesar00001978@gmail.com

الخلاصة:

هدفت الدراسة إلى تقييم كفاءة الفطر الاحيائي *Trichoderma harzianum* وبكتريا *Bacillus cereus* والمبيد الفطري Gntanol في مقاومة مرض تعفن البذور وموت البادرات على محصول الباميا الناتج من الفطرين *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* .إذ اظهرت النتائج المختبرية إن الفطر *T.harzianum* يمتلك مقدرة تضادية عالية ضد الفطرين الممرضين اذ بلغت الدرجة واحد (1) حسب مقياس Bell. كما حققت بكتريا *B.cereus* نسبة تثبيط عالية مع العزلتين F.s1 وR.s2 التي بلغت (80 و80.55)% على التوالي. كما أعطى المبيد Gntanol فعالية عالية في تثبيط نمو الفطرين الممرضين اذ بلغت 100% على الوسط ألزرعي PDA مقارنة مع معاملة السيطرة والتي كانت نسبة التثبيط لها 0%. كما أشارت النتائج ان بكتريا *B.cereus* أظهرت قدرة عالية في رفع نسبة الانبات بوجود الفطرين *F.solani* و*R. solani* والتي بلغت (80.25 و80)% على التوالي. كما ارتفعت نسبة الانبات الى (80و77.5)% على التوالي عند استخدام الفطر *T.harzianum* بوجود الفطرين الممرضين . من جانب اخر بينت النتائج وجود نسبة انبات عالية وصلت الى (88و85)%على التوالي عند استخدام معاملة التكامل الاحيائي. وبينت النتائج تحت ظروف الظلة الخشبية ان استخدام البكتريا *B.cereus* ادى الى خفض شدة الإصابة بالفطرين *F.solani* و*R. solani* الى (20 و22.25)% على التوالي ونسبة الاصابة الى (32 و35)% على التوالي. كما حقق الفطر الإحيائي *T.harzianum* انخفاض معنوي في شدة الاصابة بالفطرين الممرضين إذ بلغت (22.5 و25)% وخفض نسبة الإصابة الى (25 و30)% على التوالي. وادت معاملة التكامل الاحيائي الى خفض شدة الإصابة الى (16و18)% ونسبة الإصابة الى (23 و24)% على التوالي قياسا مع معاملة الفطرين الممرضين فقط والتي حققت شدة إصابة بلغت (80.5 و85)%على التوالي ونسبة إصابة بلغت 100% مع كلا الفطرين.

Abstract

The study aims to evaluation the efficacy biological fungus*Trichoderma harizanum* , bacteria ***Bacillus cereus*** and Gntanol fungicide in control seeds rot damping-off disease on Okra plant caused by *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* fungi . The results of the laboratory that fungus *T. harzianum* have high antagonistic activity against the two fungi pathogen which the degree one (1) according to Bell measurement. Whereas the ***B. cereus*** bacteria give high inhibition rate with fungal isolates F.s1 and R.s2 which is appeared (80 and 80.55)% respectively .Also Gntanol fungicide give inhibition rate 100% against these two pathogenic fungi on PDA media in comparison with the control factor which have the rate of inhibition 0% .Results also show the efficacy of ***B. cereus*** bacteria in increase germination rate in presence of two fungi *F. solani* and *R. solani* (80.25 and 80)% respectively. The germination rate increase (80 and 77.5)% respectively with use of *T. harzianum* fungus too in the presence of these two fungi. From the other side, the results appeared that the presence of the highest rate of germination which is reached (88 and 85)% respectively when we use the full biological treatment .Result revealed under conditional that use ***B. cereus*** bacteria decrease the severity of infection with these two fungi *F. solani* and *R. solani* (20 and 22.25)% respectively , and infection rate to (32 and 35)% respectively. So biological *T. harzianum* fungus decrease the severity of infection with two fungi (22.5 and 25)% respectively , and decrease the infection rate to (25 and 30)% respectively. And caused full biological treatment decrease the severity of infection to (16 and 18)% and infection rate to (23 and 24)% respectively. compared with two fungi treatment only which gives severity of infection (80.5 and 85)% respectively and infection rate 100% for both fungi.

المقدمة:

يعد نبات الباميا Okra, L. Moench *Abelmoschus esclentus* احد محاصيل الخضر الصيفية المهمة التابعة للعائلة الخبازية malvaceae والتي تزرع في مختلف انحاء القطر لما لها من أهمية اقتصادية ، كون ثمارها مرغوبة بدرجة كبيرة لدى اغلب سكان القطر اذ تؤكل ثمارها الخضراء بعد الطهي او تجفف . وتحتوي ثمار الباميا على بعض العناصر الغذائية كالفسفور والكالسيوم والمواد الكاربوهيدراتية والبروتينات ونسبة متوسطة من الفيتامينات كالرايبوفلافين والثيامين وفيتامين C وA [1] .

تتعرض نباتات الباميا للإصابة بالعديد من المسببات المرضية وخاصة الفطريات المسببة لتعفن البذور وموت البادرات ومن اهم هذه الفطريات *Rhizoctonia solani* ، *Fusarium solani* ، *Macrophomina phaseolina* ، *Pythium butleri* ، *Phytophthora palmivora* [2]. ان استخدام المبيدات الكيميائية في مكافحة الامراض النباتية لها تأثيرات سلبية في البيئة و صحة الانسان والاحياء غير المستهدفة وظهور سلالات من المسببات المرضية مقاومة لفعل المبيدات [3] [4]. وفي العقود الأخيرة نالت المكافحة الإحيائية للمسببات المرضية اهتماماً واسعاً باستعمال بعض الأحياء المضادة كالفطريات والبكتريا التي لها كفاءة عالية في تثبيط نمو عدد من المسببات المرضية ومن بين تلك الأحياء الأنواع العائدة للجنس *Trichoderma* ومنها النوع *T. harzianum* اذ حققت نجاحاً على مستوى تجارب البيت الزجاجي والحقل [5] وكذلك البكتريا ***Bacillus cereus*** أثبتت كفاءة عالية ضد الفطريات المسببة لأمراض تعفن جذور النبات [6] [7] .

المواد وطرق العمل

1-عزل وتشخيص الفطرين *Rhizoctonia solani* ، *Fusarium solani*.

عزل الفطرين الممرضين من بادرات الباميا التي ظهرت عليها أعراض الإصابة بمرض موت البادرات شكل 1 . أخذت 50 بادرة مصابة وغسلت بماء جاري لمدة ساعتين لإزالة الأتربة العالقة بها ثم قطعت البادرات(الجذر وجزء من الساق) إلى قطع صغيرة بطول 0.5 – 1 سم عقمت سطحياً وذلك بغمرها لمدة دقيقتين بمحلول هايبوكلورات الصوديوم 1% كلور حر ثم غسلت بعدها بماء مقطر وجففت بورق نشاف معقم. وزرعت بواقع 4 قطع في كل طبق بتري على الوسط الزرعي Potato Dextrose Agar (PDA)معقم بجهاز Autoclave ومضاف إليه المضاد الحيوي Tetracycline . حضنت الاطباق على درجة حرارة 25± 2 مْ لمدة 4 أيام.

تم تنقية مستعمرات الفطريات وذلك بأخذ جزء صغير من طرف النمو الفطري بواسطة needle ونقل الى اطباق جديدة من الوسط الزرعي (PDA) حضنت الاطباق بدرجة حرارة 25 ± 2 مْ لمدة 7 أيام . شخص الفطر *Rhizoctonia* اعتماداً على الصفات التصنيفية التي أوردها [8] لمرتبة الجنس و [9] لمرتبة النوع . وشخص الفطر*Fusarium solani* استنادا الى الصفات التي ذكرها [10] و[10].

شكل (1) يوضح اعراض الإصابة على بادرات الباميا .

A- نبات مصاب B- نبات سليم

2- تحضير لقاح عزلات الفطرين *R.solani* و *F.solani* .

اخذت بذور دخن محلية *Panicum miliaceum* وغسلت جيداً للتخلص من الشوائب و الاتربة و نقعت 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 بجهازAutoclave بدرجة حرارة 121 م° وضغط 1.5كغم /سم^2 لمدة 20 دقيقة وبعد تبريد الدوارق لقح الدخن بلقاح الفطرين *R.solani* و *F.solani* وبمعدل 4 اقراص قطر5 ملم/دورق من مستعمرة الفطر النقية بعمر 7 ايام كل فطر على انفراد حضنت الدوارق بدرجة حرارة 25 $\pm$ 2ْم لمدة اسبوعين و رجت مرة كل 5 ايام لضمان التهوية وتوزيع لقاح الفطر على جميع البذور[12].

3- اختبار القدرة الامراضية لعزلات للفطرين *R.solani* و *F.solani* في نسبة انبات بذور الباميا .

عقمت تربة مزيجية بمقدار20 كغم بجهاز Autoclave (121ْم وضغط 1.5 كغم / سم^2 لمدة ساعة) وكررت عملية التعقيم بعد 24 ساعة وتم توزيعها في خمسة اكياس من البولي اثلين 4 كغم /كيس و اضيف لقاح عزلات الفطرين Fs1،Fs2،Rs1،Rs2 بمقدار 40 غم لكل 4 كغم من التربة ولكل عزلة على انفراد وخلطت جيداً لكي يتجانس توزيع اللقاح وقسمت الى أربعة مكررات بواقع 1كغم تربة ملوثة في كل اصيص قطر15سم . اما معاملة المقارنة فقد خلطت التربة مع بذور دخن معقمة خالية من الفطر بنسبة 40 غم بذور دخن /4 كغم[13].سقيت الاصص وغطيت بأكياس البولي اثلين المثقب لمدة 48 ساعة بعدها زرعت 10 من بذور الباميا صنف حسيناوية في كل اصيص بعد غسلها جيداً وتعقيمها سطحياً بمحلول هايبوكلورات الصوديوم 1% ووضعت الاصص في الظلة الخشبية وفقاً للتصميم تام التعشية Complete Random Design (CRD). سقيت الاصص بصورة منتظمة وبعد مرور10 أيام من الزراعة تم اخذ نسبة انبات البذور حسب المعادلة التالية .

$$\text{نسبة الانبات \%} = \frac{\text{عـــدد البذور النابتة}}{\text{عـــدد البذور المزروعة}} \times 100$$

4- اختبار القدرة التضادية للفطر *Trichoderma harzianum* ضد الفطرين *F. solani* و *R. solani* على الوسط الزرعي PDA .

تم اختبار القدرة التضادية للفطر*T.harzianum* بأتباع تقنية الزرع المزدوج اذ تم توزيع الوسط الزرعي PDA في اطباق بتري قطر 9 سم بحدود 15- 20 سم^3 /طبق وتركت الاطباق لحين التصلب ثم جرى تلقيحها وذلك بأخذ قرص بقطر 0.5 سم من قرب حواف مستعمرات الفطرين الممرضين لكل عزلة Fs1،Fs2،Rs1،Rs2 و المنماة على وسط PDA بعمر7 أيام ووضع القرص في النصف الاول من الطبق أما نصف الطبق الأخر فقد تم تلقيحه بقرص قطر 0.5 سم مأخوذ من قرب حواف مستعمرة فطر المكافحة الأحيائية ،أستخدمت 4 أطباق لمعاملات الزرع المزدوج لكل عزلة أما معاملة المقارنة فقد لقحت أربعة أطباق لكل من *R.solani* و *F.solani* و *T.harzianum* كلاً على حدة ، وضعت الأطباق في الحاضنة تحت درجة حرارة 25±2 مْ لمدة 7 أيام وبعدها تم تقدير التضاد حسب سلم التقيس الخماسي المعد من قبل[14] وذلك على ما يأتي:-

درجة 1- فطر المكافحة الاحيائية يغطي مساحة الطبق بكاملة.

درجة 2- فطر المكافحة الاحيائية يغطي ثلثي مساحة الطبق والفطر الممرض يغطي ثلث مساحة الطبق .

درجة 3- فطر المكافحة الاحيائية والفطر الممرض يغطي كل منهما نصف الطبق.

درجة 4- فطر المكافحة الاحيائية يغطي ثلث مساحة الطبق والفطر الممرض يغطي ثلثي مساحة الطبق.

درجة 5- الفطر الممرض يغطي مساحة الطبق بكاملة.

ويعد فطر المكافحة الاحيائية فعالاً من الناحية التضادية عند درجة تضاد (2) او اقل مع عزلة الفطر الممرض.

* **البكتريا *Bacillus cereus*** تم الحصول على عزلة مشخصة من مختبر الاحياء المجهرية المعهد التقني / بابل.

5-اختبار القدرة التضادية لبكتريا *B. cereus* ضد الفطرين الممرضين *R.solani* و *F.solani* على الوسطPDA.

5-1-تحديد التركيز الفعال من العالق البكتيري لتثبيط نمو الفطرين *R.solani* و *F.solani*.

حضرت سلسلة تخافيف من عالق بكتريا ***B. cereus*** وذلك باخذ 1 مل من الوسط السائل Nutrient Broth (NB) الحاوية على البكتريا بواسطة محقنة طبية معقمة وأضيف الى انبوبة اختبار تحوي 9 مل ماء مقطر معقم وأجريت سلسلة تخافيف من 10^{-1} الى 10^{-8} ثم لقحت الأطباق الحاوية على الوسط PDA بأخذ 1مل من كل تخفيف من العالق البكتيري واضيف على شكل بقع (أربعة بقع) وضع في مركزها قرص بقطر0.5 سم أخذ من قرب حواف مستعمرة الفطرين *R.solani* و *F.solani* وبمعدل 4 اطباق لكل عزلة ولكل تخفيف وتركت أربعة أطباق ملقحة بالفطر للمقارنة من دون تلقيح بالبكتريا أضيف لها 1 مل ماء مقطر معقم وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 25±2 مْ لمدة 7 أيام بعد ذلك تم حساب مقدار التثبيط وذلك بحساب قطر مستعمرة الفطر النامي في معاملة البكتريا ومقارنتها بقطر مستعمرة الفطر النامي في معاملة المقارنة، وحسبت النسبة المئوية للتثبيط على وفق معادلة [15].

$$\% \text{ Inhibition} = (R_1-R_2)/R_1 \times 100$$

R_1 أقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر الممرض فقط(معاملة السيطرة).

R_2 أقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر الممرض في الاطباق المعاملة باللقاح البكتيري.

5-2- حساب الكثافة العددية للبكتريا *B. cereus*.

بعد الحصول على أقل تخفيف مثبط 10^{-5} من اللقاح للفطرين الممرضين *R.solani* و *F. solani* في الخطوة السابقة. حضرت 4 أطباق بتري بقطر 9 سم حاوية على الوسط PDA المعقم، لقحت الأطباق بعالق البكتريا تخفيف 10^{-5} بمعدل 1مل/طبق بواسطة محقنة طبية معقمة حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25±2 مْ لمدة 48 ساعة، بعدها حسبت عدد المستعمرات في كل طبق وضرب معدل المستعمرات البكتيرية في مقلوب التخفيف الفعال[16] وبناءاً على ذلك يكون عدد المستعمرات 4×10^6 (وحدة تكوين مستعمرة/مل).

3-5 اختبار القدرة التضادية للبكتريا *B. cereus* ضد بعض عزلات الفطرين الممرضين *R.solani* و *F. solani* على الوسط الزرعي PDA .

حضر وسط PDA معقم وصب في 20 طبق بتري وبعد تصلب الوسط لقحت الاطباق بقرص قطره 0.5 سم اخذ من قرب حافة مستعمرة كل عزلة من عزلات الفطرين ***F. solani*** و ***R.solani*** (Fs2, Fs1 , Rs2 Rs1,) المنماة على الوسط PDA بعمر سبعة ايام وأضيف اللقاح البكتيري بشكل بقع (Spoting) بمقدار أربعة بقع/طبق بمعدل 1 مل تركيز 4×10^6 وحدة تكوين مستعمرة / مل. بواقع 4 مكررات لكل عزلة مع ترك 4 مكررات لمعاملة السيطرة اذ اضيف لها 1 مل ماء معقم فقط. حضنت الاطباق بدرجة حرارة 25مْ± 2 لمدة 7 ايام بعدها حسب مقدار التثبيط كما متبع في الفقرة السابقة 5-1.

6- تقييم فعالية المبيد Geltanol في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين الممرضين *R.solani* و *F.solani* على وسط PDA

حضر وسط PDA معقم بدوارق زجاجية سعة 500 مل وأضيف المبيد Geltanol بتركيز 1 مل/لتر ، صب الوسط في أطباق بتري معقمة بقطر 9 سم وبعد التصلب لقحت الاطباق في مركزها بقرص بقطر 0.5 سم من نموات الفطرين الممرضين *R.solani* و *F.solani* بعمر 7 ايام كلا على انفراد أما معاملة المقارنة فقد أحتوت الاطباق على الوسط PDA بدون إضافة المبيد اليها ولقحت بلقاح الفطرين الممرضين واستعملت 4 أطباق لكل معاملة حضنت الاطباق عند درجة حرارة 25±2مْ لمدة7 ايام سجلت النتائج بحساب متوسط قياس قطرين متعامدين من كل مستعمرة بعد وصول نمو الفطرين الممرضين في معاملة المقارنة إلى حافة الطبق وتم حساب النسبة المئوية للتثبيط بأتباع المعادلة في الفقرة 5-1 .

7-تقييم كفاءة عاملي المكافحة الاحيائي *B. cereus* و*T. Harzianum* في نسبة انبات بذور الباميا ونسبة وشدة الإصابة بوجود الفطرين الممرضين *F.solani* و*R.solani* .

نفذت التجربة تحت ظروف الظلة الخشبية في بداية شهر اذار2016 واستخدمت في هذه التجربة تربة مزيجية وبتموس بنسبة (1:2 حجم/حجم) معقمة بجهاز Autoclave . وزعت في اصص بلاستيكية بقطر 15 سم بواقع 1 كغم تربة مزيجية و تضمنت التجربة المعاملات الاتية وبأربعة مكررات لكل منها كما يأتي:

1- control .
2- الفطر *F.solani* + البكتريا *Bacillus cereus* .
3- الفطر *R.solani* + البكتريا *Bacillus cereus* .
4- الفطر *F.solani* +الفطر*T.harzianum* .
5- الفطر *R.solani* +الفطر*T.harzianum* .
6- الفطر *F.solani* +الفطر*T.harzianum* +*B. cereus*
7- الفطر *R.solani* +الفطر*T.harzianum* +*B. cereus*
8- الفطر*T.harzianum* +*B. cereus*
9- الفطر *F.solani* +المبيدGeltanol .
10- الفطر *R.solani* +المبيدGeltanol .
11- الفطر*T.harzianum* فقط .
12- البكتريا *Bacillus cereus* فقط .
13- المبيدGeltanol فقط.
14- الفطر *F.solani* فقط .
15- الفطر *R.solani* فقط .

أضيف كل من الفطر الاحيائي *T. harzianum* والفطرين الممرضين *F.solani* و*R.solani* الى التربة بنسبة 1% (وزن/وزن) المحمل على بذور الدخن أي ما يعادل 10غم /اصيص اذا اضيف الفطرين*F.solani* و*R.solani* لكل المعاملات التي تتطلب اضافة الفطر الممرض كلاً على انفراد وخلط جيداً مع التربة واضيف عامل المكافحة الاحيائية *T. harzianum* قبل اسبوع من اضافة الفطر الممرض[17] وذلك بخلطه جيداً مع التربة . واضيف عالق البكتريا *Bacillus cereus* الى تربة الاصص بمعدل 7.5 مل /اصيص [18]اخذ من مزرعة عمرها ثلاثة ايام ومن تركيز 4×10^6 (وحدة تكوين مستعمرة /مل) . كما اضيف عاملي المكافحة الإحيائية *T. harzianum* و البكتريا *B. cereus* بشكل متكامل الى التربة. اما معاملة المبيد Geltanol فقد نفذت بعد يوم من اضافة لقاح الفطر الممرض وبتركيز 0.75 مل / لتر وبمعدل 25 مل لكل اصيص[19]. اما معاملة المقارنة اضيف لها بذور دخن معقمة فقط بنسبة 1% (وزن/وزن) بدون فطر ممرض. وضعت الاصص في الظلة الخشبية على وفق التصميم تام التعشية وبأربعة مكررات لكل معاملة سقيت الاصص حسب الحاجة وبعد مرور 10 ايام تم اخذ نسبة انبات البذور حسب المعادلة في الفقرة (3) وبعد اربعة اسابيع من الزراعة قلعت النباتات وتم تقدير نسبة وشدة الاصابة بأتباع الدليل المرضي الاتي :

*الدليل المرضي المتبع بوجود الفطر*F.solani* .
0= النبات سليم ، والمجموع الجذري ابيض اللون.
1 = تلون 1-25 من الجذر بلون بني فاتح .

2 = تلون أكثر من25-50 من الجذر بلون بني غامق .
3 = تلون أكثر من 50-75 من الجذر بلون بني غامق مع اصفرار الاوراق .
4 = تلون أكثر من 75-100 من الجذر بلون بني غامق مع موت النبات .

*الدليل المرضي المتبع بوجود الفطر *R.solani*.
0= النبات سليم ، والمجموع الجذري ابيض اللون.
1= تلون الجذر بلون بني مصفر وتقرح بقطر اقل من 10ملم حول الساق .
2 = تلون الجذر بلون بني غامق وتقرح بقطر11- 20 ملم حول الساق.
3 = تقرح بلون بني محمر يحيط بالساق إحاطة كاملة .
4 = موت النبات.
وحسبت النسبة المئوية لشدة المرض حسب معادلة [20] الواردة في[21].

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

*تصميم التجارب وتحليلها

استخدم التصميم تام التعشية Complete Random Design (C.R.D) للتجارب المختبرية وتجارب الظلة الخشبية وقورنت المعدلات على اختبار اقل فرق معنوي Least Significant Difference (L.S.D) وتحت مستوى احتمالية(0.05) [22].

النتائج والمناقشة

1-اختبار المقدرة الامراضية لعزلات للفطرين *R.solani* و *F.solani* في نسبة انبات بذور الباميا .

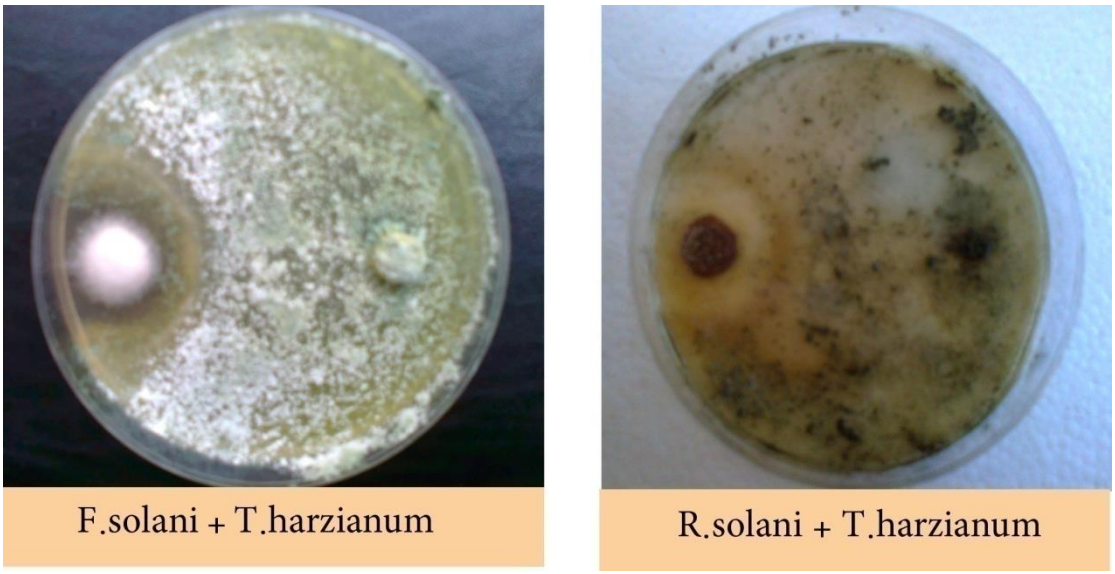
اوضحت نتائج هذا الاختبار الجدول1 ان كافة عزلات الفطرين Fs1،Fs2،Rs1،Rs2 المختبرة أحدثت خفضاً معنوياً في نسبة انبات بذور الباميا اذ بلغت نسبة الانبات في معاملاتها (47.5، 37.5 ، 33 ، 40)% على التوالي قياساً الى معاملة المقارنة التي بلغت نسبة انبات البذور فيها 100 % . تباينت عزلات الفطرين الممرضين فيما بينها في خفض نسبة الانبات اذ كان اكثر هذه العزلات تأثيراً في نسبة انبات بذور الباميا هي العزلة Rs1 والتي انخفضت نسبة الانبات في معاملتها الى 33%. وقد يعود انخفاض نسبة الانبات الى انتاج هذه الفطريات من المركبات السامة للنبات Phytotoxin مثل Fusarubin وdihydrofusarubin و Phenyl Acetic Acid اذ ان العزلات ذات المقدرة الامراضية العالية تمتاز بأفرازها كمية من هذه المواد الايضية اكبر من العزلات ذات مقدرة امراضية ضعيفة وهذا ما اكده عدد من الباحثين[23] و[24].

جدول 1 اختبار القدرة الامراضية لعزلات للفطرين *R.solani* و *F.solani* في نسبة انبات بذور الباميا .

ت	نوع المعاملة	رمز العزلة	%لنسبة الانبات
1	*Fusarium solani*	FS1	47.5
2	*Fusarium solani*	FS2	37.5
3	*Rhizoctonia solani*	RS1	33
4	*Rhizoctonia solani*	RS2	40
5	control	-	100
L.S.D عند مستوى 0.05			8.38
*كل رقم في الجدول يمثل معدل أربعة مكررات			

2- اختبار القدرة التضادية للفطر *T. harzianum* ضد عزلات الفطرين *F. solani* و *R. solani* على الوسط الزرعي PDA .

أظهرت النتائج الموضحة في شكل 2 وجود قدرة تضادية عالية بين الفطر الاحيائية *T. harzianum* وباقي العزلات المختبرة .اذ بلغت الدرجة (1) مع الفطرين الممرضين *F. solani* و *R. solani* حسب سلم التقيس الخماسي الذي وضعة[14] وذلك بعد سبعة ايام من التحضين . وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه بعض الباحثين الذين أشاروا الى القابلية التضادية للفطر *T. harzianum*والفطريات الممرضة للنبات مثل الممرضين *F. solani* و *R. solani* [25] و[26] . وقد يعود السبب في المقدرة التضادية لفطر المقاومة الاحيائية الى التطفل المباشر لهذا الفطر على الغزل الفطري للفطر الممرض والالتفاف حوله وتحليل جدران الخلايا من خلال افراز انزيمات chitinase وB-1,3 gluconase وهذا ما اكده [27] و[28] أضافة إلى أمتلاك الفطر *T.harzianum* قدرة تنافسية على الغذاء والمكان[26] .



شكل 2 يوضح القدرة التضادية للفطر *T. harzianum* ضد عزلات الفطرين *F. solani* و *R. solani* على الوسط الزرعي PDA .

3-اختبار القدرة التضادية للبكتريا *B. cereus* ضد الفطرين الممرضين *R.solani* و*F.solani* على الوسط الزرعي PDA .

أوضحت النتائج في جدول 2 بأن البكتريا ***B. cereus*** بتركيز 4×10^6 وحدة تكوين مستعمرة/ مل امتلكت قدرة تضادية عالية ضد الفطر الممرض ***R.solani*** على وسط PDA شكل3 .اذ حققت نسبة تثبيط بلغت(77.77و80.55)% مع العزلتين R.S1و R.S2 على التوالي مقارنة مع معاملة السيطرة التي بلغت نسبة التثبيط لها 0%. واتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه[7]. كما ادت البكتريا ***B. cereus*** وبنفس التركيز الى تثبيط الفطر الممرض ***F.solani*** وبنسب بلغت 80%و75% مع العزلتين F.s1 وF.s2 على التوالي مقارنة مع معاملة السيطرة التي بلغت نسبة التثبيط لها 0%. واتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه [6]. وقد تعود كفاءة البكتريا *B.cereus* في القدرة التضادية الى انتاجها أنواع مختلفة من المركبات التي لها القدرة على كبح المسببات المرضية للنبات وهذه المركبات تشمل مضادات حيوية ببتيدية وأنزيمات محللة مثل Protease وChitinase و Gluconase[29].

جدول 2 اختبار القدرة التضادية للبكتريا *Bacillus cereus* ضد الفطر الممرض *R.solani* و*F.solani* على الوسط الزرعي PDA .

نوع المعاملة		معدل النمو القطري للفطر الممرض (سم)	نسبة تثبيط الفطر(%)
R.S1 + *B. cereus*		2.00	77.77
R.S2 + *B. cereus*		1.75	80.55
F.S1 + *B. cereus*		1.80	80
F.S2 + *B. cereus*		2.25	75
R.S	Control	9.00	0.00
F.S		9.00	0.00
كل رقم في الجدول يمثل معدل أربعة مكررات			

شكل 3 اختبار القدرة التضادية لبكتريا ***B. cereus*** ضد الفطر *R.solani* على الوسط الزرعي PDA .

4-تقييم فعالية المبيد Geltanol في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين الممرضين *R.solani* و *F.solani* على وسط PDA .

بينت نتائج هذا الأختبار الجدول 3 أن أستخدام مبيد Geltanol بتركيز 1مل/ لتر أدى إلى تثبيط نمو الفطرين *R.solani* و *F.solani* بشكل كامل بنسبة 100% اذ كان معدل النمو القطري للفطرين الممرضين 0%. مقارنة مع معاملة السيطرة التي بلغ معدل النمو القطري لها 9 سم وتعود كفاءة هذا المبيد للمادة الفعالة Chinosol المضادة للفطريات. وتتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه [19] والذي اشار الى ان المبيد Geltanol حقق نسبة تثبيط بلغت 100% للفطر الممرض *F. oxysporum* .

الجدول 3 تقييم فعالية المبيد Geltanol في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين *R.solani* و *F.solani* على الوسط PDA .

نوع المعاملة		معدل النمو القطري (سم)	نسبة التثبيط %
+ Geltanol	FS1	0.00	100
	FS2	0.00	100
	RS1	0.00	100
	RS2	0.00	100
Control	FS	9.00	0.0
	RS	9.00	0.0

5-تقييم كفاءة عاملي المكافحة الاحيائي *B. cereus* و*T.harzianum* في النسبة المئوية لانبات بذور الباميا بوجود الفطرين الممرضين *F.solani* و*R.solani*.

أوضحت النتائج في جدول 4 إن جميع المعاملات المستخدمة في التجربة حققت زيادة معنوية في رفع نسبة الإنبات لبذور الباميا والتي تراوحت بين (77.5 - 100)% قياساً مع معاملتي الفطرين الممرضين *F.solani* و*R.solani* والتي بلغت (37.5 و35)%على التوالي. اذ بينت النتائج كفاءة عاملي المكافحة الإحيائية البكتريا *B. cereus* و الفطر*T.harzianum* في رفع النسبة المئوية للإنبات بوجود الفطرين الممرضين *F.solani* و*R.solani* كلاً على انفراد. فقد أدت البكتريا *B. cereus* الى رفع نسبة الإنبات الى (80.25 و80)% على التوالي .كما أدى استخدام الفطر*T.harzianum* الى رفع نسبة الإنبات بوجود الفطرين الممرضين إذ بلغت (80 و77.5)% على التوالي واتفقت هذه النتائج مع ما توصل اليه[30] بان الفطر *T.harzianum* ادى الى رفع نسبة إنبات بذور النارنج بوجود الفطر الممرض *R.solani* و ما أكده[13] بان الفطر*T.harzianum* ادى الى رفع نسبة الانبات الى 75% بوجود الفطر الممرض *F.solani* .أما معاملة التكامل بين عاملي المكافحة الإحيائية كانت هي الأكفاء اذ حققت نسبة إنبات بلغت (88 و85)% على التوالي عند إضافتهما بشكل مزدوج واختلفت هذه المعاملات معنويا عن معاملة الفطرين الممرضين . وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه[31] الذي أشار الى ان استخدام عوامل المكافحة الإحيائية بشكل مزدوج كان هو الأكفاء من بين المعاملات الأخرى في مقاومة الفطريات المسببة لمرض موت البادرات .

الجدول 4 تقييم كفاءة عاملي المكافحة الاحيائي ***B. cereus*** و*T.harzianum* في نسبة انبات بذور الباميا بوجود الفطرين الممرضين *F.solani* و*R.solani*.

ت	المعاملات	% للانبات
1	Control	100
2	الفطر *F.solani* + البكتريا *B. cereus*	80.25
3	الفطر *R.solani* + البكتريا *B. cereus*	80
4	الفطر *F.solani* +الفطر *T.harzianum*	80
5	الفطر *R.solani* +الفطر*T.harzianum*	77.5
6	الفطر *F.solani* +الفطر*B. cereus*+ *T.harzianum*	88
7	الفطر *R.solani* +الفطر*B. cereus*+ *T.harzianum*	85
8	الفطر*B. cereus*+ *T.harzianum*	100
9	الفطر*T.harzianum* فقط	100
10	البكتريا *B. cereus* فقط	100
11	الفطر *F.solani* +المبيدGELTANOL	100
12	الفطر *R.solani* +المبيدGELTANOL	100
13	المبيدGELTANOL فقط	100
14	الفطر *F.solani* فقط	37.5
15	الفطر *R.solani* فقط	35
	LSD عند مستوى(0.05)	12.64

6-تقييم كفاءة عاملي المكافحة الاحيائي *B. cereus* و*T. Harzianum* في نسبة وشدة الإصابة على نبات الباميا بوجود الفطرين الممرضين *F.solani* و*R.solani* .

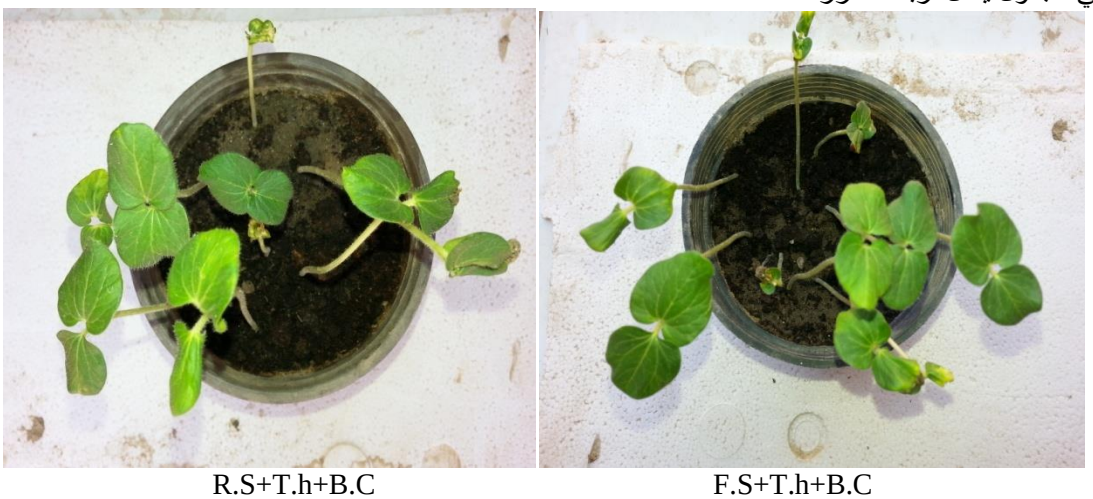
بينت النتائج المشار اليها في جدول 5 ان استخدام البكتريا *B. cereus* أدى الى خفض شدة الإصابة بالفطرين الممرضين *F.solani* و*R.solani* اذ بلغت (20 و22.25)% على التوالي ونسبة الاصابة الى (32 و35)% على التوالي. ويعود سبب قدرة بكتريا *B.cereus* على تثبيط الفطرين الممرضين *F.solani* و إلى إنتاجها المضادين الحيويين Zwittermicin A و Kanosamicin إضافة إلى إنتاجها عدداً من الأنزيمات مثل إنزيم Endogluconase وإنزيم Chitinase الذي يقوم بتحطيم مادة الكايتين الموجودة في جدران الخلايا الفطرية وإنزيم Gluconase و Protease التي تقوم بتحطيم مكونات الخلية الفطرية[32] و[33].كما ان البكتريا *B.cereus* تعمل على زيادة إنتاج البروتينات الخاصة بالمقاومة مما يؤدي الى استحثاث المقاومة الجهازية لدى النبات[34] .وتتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه [7] والذي اشار الى كفاءة البكتريا *B. cereus* في خفض نسبة وشدة الإصابة بالفطر الممرض*R.solani* .وما توصل اليه [6] الى ان البكتريا *B.cereus* تمتلك مقدرة تضادية عالية في مقاومة الفطر الممرض *F.solani* عند استخدامها في برامج المكافحة الاحيائية.

من جانب اخر اشارت النتائج إن عامل المكافحة الإحيائية *T.harzianum* قد حقق خفضاً معنوياً في شدة الإصابة بالفطرين الممرضين*F.solani* و*R.solani* اذ بلغت (22.5 و25)% على التوالي وخفض نسبة الإصابة الى (25 و30)% على التوالي قياسا مع معاملة المقارنة (الفطر الممرض فقط) والتي حققت شدة اصابة بلغت(80.5 و85)%على التوالي ونسبة إصابة بلغت 100% مع الفطرين الممرضين . وقد يعود السبب في المقدرة التضادية العالية للفطر*T. harzianum* ضد الفطر الممرض وحماية البادرات من الاصابة الى احاطة جذور البادرات منذ بداية انبات البذور بمستعمرات الفطر *T. harzianum* وابعاد المسبب المرضي عن طريق المنافسة على المكان فضلاً لما ينتجة هذا الفطر من انزيمات مضادة للمسببات المرضية مثل Chitinase و *B*-1,3 glucanase وproteases والتي تعمل على تحليل جدران خلايا الفطر الممرض مما يقلل من حدوث الاصابة [28] و[5]. وتتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه [35] إذ اشاروا الى طبيعة تضاد مماثلة بين عامل المكافحه الاحيائية *T. harzianum* والفطريات الممرضة للنبات مثل *R.solani*، *F.solani*.كما أدت معاملة التكامل باستخدام عاملي المكافحة الاحيائية بشكل مزدوج شكل 4 الى خفض شدة الإصابة بالفطرين الممرضين*F.solani* و*R.solani* اذ بلغت (16 و18)% على التوالي ونسبة الاصابة الى (23 و24)% على التوالي مقارنة مع معاملة السيطرة (الفطرين الممرضين فقط). واتفقت هذه النتيجة مع ما اشار اليه[31] الى ان استخدام البكتريا*B.subtilis* مع الفطر *T. harzianum* بشكل مزدوج اعطى نتائج افضل في مقاومة الفطر*F.solani* من استخدامها بشكل منفرد.كما بينت النتائج كفاءة المبيد Geltanol في مقاومة الفطرين *F.solani* و*R.solani* والذي ادى الى خفض شدة ونسبة الاصابة الى 0% وتتفق هذه النتيجة مع نتائج التجارب المختبرية اذ حقق المبيد Geltanolتثبيط كامل لنمو الغزل الفطري للفطرين *F.solani* و*R.solani* على وسط PDA كما تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه[19] والذي اشار الى ان المبيد Geltanol حقق نسبة تثبيط بلغت 100% للفطر الممرض*F. oxysporum* .

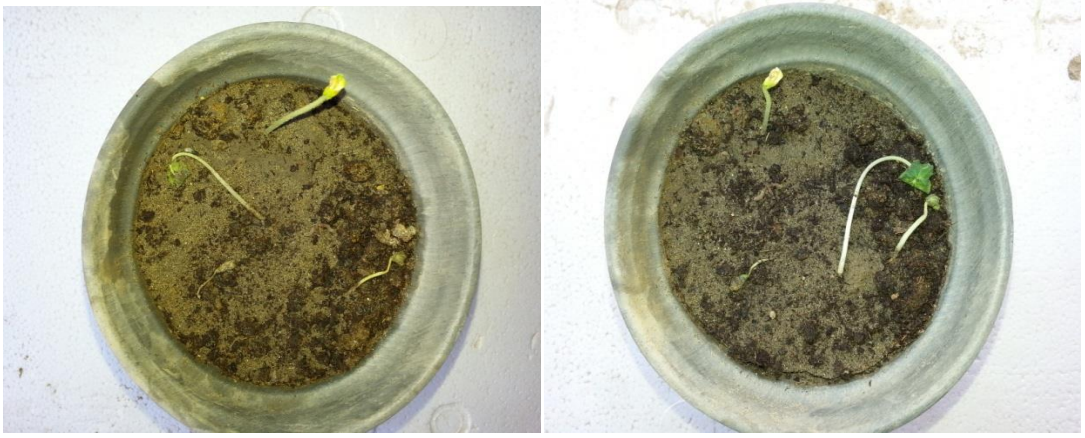
الجدول 5 تقييم كفاءة عاملي المكافحة الاحيائي ***B. cereus*** و*T. Harzianum* في نسبة وشدة الإصابة بوجود الفطرين الممرضين *F.solani* و*R.solani*.

ت	المعاملات	% لشدة الاصابة	% لنسبة الاصابة
1	Control	0.0	0.0
2	الفطر *F.solani* + البكتريا *B. cereus*	20	32
3	الفطر *R.solani* + البكتريا *B. cereus*	22.25	35
4	الفطر *F.solani* +الفطر *T.harzianum*	22.5	25
5	الفطر *R.solani* +الفطر *T.harzianum*	25	30
6	الفطر *F.solani* +الفطر *T.harzianum* +*B. cereus*	16	23
7	الفطر *R.solani* +الفطر *T.harzianum* +*B. cereus*	18	24
8	الفطر *T.harzianum* +*B. cereus*	0.0	0.0
9	الفطر *T.harzianum* فقط	0.0	0.0
10	البكتريا *B. cereus* فقط	0.0	0.0
11	الفطر *F.solani* +المبيد GELTANOL	0.0	0.0
12	الفطر *R.solani* +المبيد GELTANOL	0.0	0.0
13	المبيد GELTANOL فقط	0.0	0.0
14	الفطر *F.solani* فقط	80.5	100
15	الفطر *R.solani* فقط	85	100
	LSD عند مستوى(0.05)	2.30	1.48

كل رقم في الجدول يمثل أربعة مكررات



R.S+T.h+B.C F.S+T.h+B.C



R.solani F.solani

شكل 4 يوضح معاملات التكامل الاحيائي بوجود الفطرين الممرضين ***R.solani*** و***F.solani***

1- *F.S* = *F.solani*
2- *R.S* = *R.solani*
3- *T.h* =*T.harzianum*
4- *B.C* =*B.cereus*

المصادر:

1- الركابي، فاخر ابراهيم وعبد الجبار جاسم .1981. كتاب إنتاج الخضر .هيئة المعاهد الفنية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . بغداد .العراق.

2- Mithal,M.J.2006.low cost and pollution free technology against root rot of okra.www.pakistan .com.

3- Kotze, J.M., Dutoit, F.L. & Durand, B.J. 1982. Pre-harvest chemical control ofanthracnose, sooty blotch and cercospora spot of avocados. *South African AvocadoGrowers' Association Yearbook* 5: 54 - 55.

4- McGovern , R.J., W.H. Elmer , D.M. Geiser and B.K. Harbaugh. 2002. Biology , epidemiology and integrated management of disease caused by Fusarium in potted orinamental progress reports . http : // endowment. Org / archives / 2002 / 06 / biolog – epidemiology – and – integrated.

5- Zeilinger,S.and Omann.M.2007. *Trichoderma* Biocontrol signal transduction pathways in volved in host sensing and mycoparasitism .Vienna university of technology.227-234.

6- Caroline. F. A, Olubukola. O. B and Faheem .A.2013. Antagonistic Effects of Bacillus Species in Biocontrol of Tomato Fusarium Wilt.Ethno Med, 7(3): 205-216 (2013).

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 .

8-Barnett, H.L and B.B. Hunter (2006). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company. 241 pp.

9- Ogoshi, A. (1987). Ecology and pathogenicity of anastomosis and interaspecific groups of *Rhizoctonia solani* (Kuhn). Ann. Rev. Phytopathol.25:125-143.

10- Gerlach.W,Nirenberg.H,1982.the Genus Fusarium - a pictorial Atlas. Printed in Germany by Arno Brynda Gmb H.Germany.406 pp.

11- Leslie, J. F., and B.A. Summerell . 2006 . The *Fusarium* Laboratory manual pp212 www.blackwellprofessional.com .

12- 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.

13- الحسناوي.انتصار مرزوك حسين.2011. تقويم كفاءة بعض برامج المكافحة الإحيائية والمتكاملة في السيطرة على مرض تعفن الجذور لشتلات النارنج المتسبب عن الفطر *Fusarium solani*.رسالة ماجستير- الكلية التقنية –المسيب .

14- Bell, D. K.; H. D. Well, and G. R. Markham . 1982 . Invitro antagonism of *Trichoderma Spp*. against six fungi, Plant pathogens. Phytopathology. 72: 379-382.

15- Paultiz T.C ,T. Zhou and L. Rankin 1992.Selection of Rhizosphere bacteria for biological control of *pythium aphanidermatum* on hydroponically grown cucumber. Biological control 2:22-237.

16- Clark, F. E ; 1965 . Agar–plats method for total microbial count. C. F: Black, 1965. Method of soil analysis part. 2. Publisher Madison Wisconson, U.S. A. pp. 1572.

17- المالكي،2002. بشرى صبير عبد السادة. تأثير المخلفات الحيوانية والمقاومة الاحيائية في الفطر *Pythium aphanidermatum*المتسبب لمرض تعفن بذور وموت بادرات الخيار. رسالة ماجستير.كلية الزراعة.جامعة بغداد.

18- Larkin, R.P. 2004. Development of integrated biological and cultural approaches for control of powdery scab and other soil borne disease . USDA , ARS , New England plant , soil , and Water lab Univer. of Maine , Orone , MEO 44469 WWW- Maine potatoes. com / pdf/potresgrant-04.

19- الحسناوي،انتصار مرزوك حسين.2014. تقييم كفاءة عاملي المكافحة الاحيائية *Trichoderma harzianum* و *Pseudomonas fluorescens* وبعض المبيدات الفطرية في مكافحة مرض الذبول الفيوزارمي على الرقي المتسبب عن الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* مجلة الفرات للعلوم الزراعية – 6(4) 446-459.

20- Mckinney, H. H. Influence of soil temperature and moisture on Infection of Wheat seeding by *Helminthosporium sativum*. J. Agri. Research 26:195-217(1923).(C.F)

21- Juber, K. S.1996. Biological control for diseases complex of root knot nematode *Meloidogyne javanica* and the fungus *Fusarium solani*. Ph. D. thesis college of Agri. University of Baghdad.

21– الراوي،خاشع محمود وعبد العزيز محمد خلف الله.2000.تصميم وتحليل التجارب الزراعية. كلية الزراعة. الطبعة الثانية . جامعة الموصل. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جمهورية العراق.

23- Mandova, N. B.; R. G. Orellana; J. D. Warther ; J. E. Werely ; S. R. Duthy ; H. Finegerd and B. C. Weathington (1980). Phtotoxins in *Rhizoctonia solani*: Isolation and biological activity of M. hydroxy and M. methoxy Phenylacetic acid. J. Agric. Food Chem.28:71 .

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

25- Kuguk, C. and M. Kivang. 2002. Isolation *Trichoderma* spp and determination of their antifungal, biological control and physiological future. Turkey. J. Biol. 27: 247-253.

26- Sallam,N.M,K.A. Abo-Elyousr, and M. A. E. Hassan. 2008. Evaluation of phaseolus vulgaris L. and efficacy of suggested formula. Egypt J. phytopathol, 36(1 – 2) 81- 93.

27- Limon, M. C., Pintro-Toro, L. A., and Benitez, T. 1999. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* trans formants that over express a33 kolachitinase. Phytopathology. 89. 254 – 261.

28- Verma,M;Satinder.K.B.Tyagi.R.D.Surampalli.R.Y.and Valero. J.R.2007.Antagronistic fungi. *Trichoderma* spp .Biochemical Engineering Journal 37 (2007) 1-20.

29- Priest, F. 1993. Systematics and ecology of *Bacillus* P. 3-16 In: *Bacillus subtilis* and other Gram-Positive Bacteria, Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.

30- البهادلي، كاظم حسين كاظم 2009. عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لجذور أشجار الحمضيات وتأثيرها في مرض تعفن الجذور وتدهور شتلات النارنج ومقاومة المرض إحيائيا. رسالة ماجستير. كلية الزراعة جامعة الكوفة.

31- Morsy.E.M;Abdel-Kawi.K.A.andKhalil.M.N.2009.Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as Biocontrol agents gainst *Fusarium solani* on tomato plants .pp.47-57.

32- Shang, H.; J. Chen; J. Handelsman; and R.M. Goodman.1999. Behavior of *Pythium torulosum* zoospores during their interaction with tobacco roots and *Bacillus cereus*. Current Microbiology. International Journal 38: 199-204 . Springer-Verlag. New York .,

33- Piza, F.A.; A.P. Siloto; and C.V. Carvalho. 1999. Production of chitosanase from *Bacillus cereus*. Brazilian Journal of chemical engineering . . Sao Paul. Brazil. 16 . N: 2.

34- Reginaldo .S. R , Roberto. L. F , Dirceu .M , Flavio A.O. and Harllen S.A.2010.Evidence that the biocontrol agent Bacillus cereus synthesizes protein that can elicit increased resistance of tomato leaves to Corynespora cassiicola. Tropical Plant Pathology, vol. 35, 1, 011-015 (2010).

35- Zahoor .A , , Fazli. R , Hakim. K. AND Muhammad. I.2012. Chemical and biological Control of Fusarium Root Rot of Okra. Pak. J. Bot., 44(1): 453-457, 2012.