# تاثير بعض العوامل الاحيائية والكيميائية في السيطرة على مرض تعفن جذور نبات البيتونيا *Petunia Hybrida* المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani*

منتظر محسن كاظم الجنابي فضل عبد الحسين الفضل
قسم وقاية النبات - كلية الزراعة – جامعة الكوفة – جمهورية العراق

**المستخلص**

اجريت هذه الدراسة لتقييم كفاءة بعض العوامل الاحيائية والكيميائية في السيطرة على مرض تعفن جذور نبات البيتونيا *Petunia Hybrida* المتسبب عن الفطر الممرض *Rhizoctonia solani* اظهرت النتائج ان للفطر *R. solani* امراضية عالية لبذور نباتات البيتونيا في اطباق بتري اذ ادى الى تعفن البذور بنسبة 100 %، عند دراسة تاثير بعض العوامل الاحيائية والكيميائية والتداخل فيما بينها في مكافحة مرض سقوط بادرات المتسبب عن الفطر *R. solani* اذ أظهرت النتائج أن لعوامل المقاومة الاحيائية قدرة تضادية عالية في تثبيط نمو الفطر *R. solani* في الأوساط الزرعية إذ بلغت منطقة التثبيط 2سم بين الفطر *Trichoderma harzianum* والفطر *R. solani* ، وان البكتريا الحيوية *Pseudomonas fluorescens* ادت الى تثبيط الفطر الممرض *R. solani* كليا في اطباق بتري اذ بلغت نسبة التثبيط 100 % كما حققت البكتريا *Bacillus subtilis* تثبيطا بلغ 94.44%لنمو الفطر الممرض و أظهرت النتائج أن المبيد Topsin - M قد ثبط بشكل كامل نمو الفطر الممرض *R. solani* عند استخدامه بالجرعة الموصى بها ، شخص الفطر المعزول عن طريق استخدام تقنية (Polymerase Reaction Chain، PCR) وتبين من خلال التشخيص ان الفطر *R. solani* يسجل لأول مرة في العراق على نبات البيتونيا .

الكلمات المفتاحية : نبات البيتونيا ، الفطر *Rhizoctonia solani*

---

البحث جزء من رسالة الماجستير للباحث الاول

## المقدمة Introduction

تـؤدي نباتـات الزينـة دورا مهمـا فـي حيـاة الشعوب والمجتمعات لما لها من دور مهم في النـواحي الترفيهيـة والجماليـة فـي الحـدائق العامـة والمتنزهـات والشـوارع الرئيسـة اذ تضـفي جمـالا كبيـرا علـى المـدن ، ولهـا تـأثير علـى الحالـة النفسـية والمزاجيـة للإنسـان لمنظرهـا الجميـل وللـروائح العطريـة المنبعثـة منهـا ، ( 30). نبـات البيتونيـا *Petunia Hybrida* متفـرع واصـنافه امـا متوسـطة او قصـيرة الارتفـاع مـن 60 – 80 سـم وهنـاك اصـناف حديثـة متدليـة او متسـلقة وتكـون متعـددة الالـوان والاصـناف البريـة مـن نبـات البيتونيـا تكـون ذات لـون بنفسـجي او ابـيض .يتكـاثر البيتونيـا بالبـذور ،والازهـار تكـون غيـر قابلـة للقطـف و يتعـرض نبـات البيتونيـا لأمـراض عديـدة منهـا تبقـع الاوراق وتعفـن الجـذور والامـراض الفايروسـية (2 ) ، لـذلك اسـتخدمت المكافحـة الاحيائيـة علـى نطـاق واسـع فـي السـنوات الاخـرة مـن قبـل البـاحثين باسـتعمال بعـض الأحيـاء المضـادة ومـن بـين تلـك الأحيـاء الأنـواع العائـدة للجـنس *Trichoderma* وخصوصـا *Trichoderma harzianum* وكـذلك البكتريـا *Bacillus subtilis* وبكتريـا *Pseudomonas fluorescens*، اذ حققـت نجاحـا علـى مسـتوى تجـارب البيـت الزجـاجي والحقل (24 ، 29 ، 3 ، 1).

مـن بـين أكثـر الكائنـات اسـتعمالاً فـي السـيطرة الحيويـة هـو الفطـر *Trichoderma harzianum* بسـبب سـهولة عزلـه وسـرعة تكـاثره وعـدم احتياجـه إلـى متطلبـات غذائيـة خاصـة وتـأثيره الإيجـابي فـي نمـو كثيـر مـن النباتـات فضـلاً عـن تـأثيره الإيجـابي فـي ايقـاف نمـو الكثيـر مـن المسـببات المرضـية للنبـات وباليـات وطـرق مختلفـة ، امـا بكتريـا *Bacillus subtilis*فهـي الاخـرى قـد اعطـت كفـاءة عاليـة للسـيطرة علـى بعـض الممرضـات الفطريـة فـي العـراق (4) وبـالرغم مـن التوجـه نحـو المقاومـة الأحيائيـة والسـلبيات المختلفـة للمكافحـة الكيميائيـة لكـن فـي النهايـة لا يمكننـا الاسـتغناء عـن المكافحـة الكيميائيـة عنهـا و لكـن يجـب اسـتعمالها بطريقـة علميـة مدروسـة للتقليـل مـن التلـوث البيئـي ومـا يـنجم عنهـا مـن سـلبيات مختلفة .

يسـبب الفطـر *Rhizoctonia solani* امـراض عديـدة تصـيب نباتـات الزينـة ومـن اهمهـا مـوت بـادرات وتعفـن الجـذور وعفـن السـاق تـؤدي الـى خفـض فـي نوعيـة وكميـة النبـات المصـاب (31) .وللسـيطرة علـى الفطـر الممـرض *Rhizoctonia solani* او التقليـل مـن الاضـرار ، تسـتخدم نباتـات او اصـناف نباتيـة مقاومـة وكـذلك تسـتخدم مبيـدات وقائيـة فطرية للسيطرة على الفطر الممرض (14) .

ونظـراً لقلـة الدراسـات حـول امـراض نباتـات الزينـة فـي العـراق بصـورة عامـة ومحافظـة النجـف الاشـرف بصـورة خاصـة و لانتشـار اعـراض مـرض تعفـن الجـذور وسـقوط البـادرات المتسبب عـن الفطـر *Rhizoctonia solani* علـى بعـض نباتـات الزينـة ومنهـا

البيتونيا فقد تم اختيار هذا الموضوع الذي تضمن النقاط الاتية :

1- عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لأمراض بعض نباتات الزينة باستخدام عدة اوساط زرعيه مختلفة و اختبار القدرة الامراضية لها

2- تشخيص اهم الفطريات باستخدام تقنية الـ PCR

3- اختبار كفاءة بعض عوامل المقاومة الاحيائية *Trichoderma harzianum*، *Pseudomonas fluorescens*، *Bacillus subtilis* في مكافحة المسبب المرضي

## المواد وطرائق العمل Materials and Methods

الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة

تم استخدام عدد من الاوساط الغذائية لتنمية الفطريات والبكتيريا في الدراسة وكما يلي:-

وسط البطاطا دكستروز اكار (P.D.A.) Potato Dextrose Agar

الاكار المغذي الجاهز Nutrient Agar

الوسط المغذي السائل Nutrient Broth

عزل وتشخيص الفطريات المستخدمة في الدراسة .

عزل وتشخيص الفطر *Rhizoctonia solani* من جذور وقواعد سيقان نباتات البيتونيا المصابة بالمرض

نقلت العينات النباتية ( نبات البيتونيا ) إلى المختبر و غسلت بصورة جيدة ، وبعدها قطعت العينات إلى قطع صغيرة بطول 0.5-1سم وتم تعقيمها سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم تركيز 10% من المحلول التجاري لمدة دقيقتين ، ثم غسلت بالماء الجاري عدة مرات للتخلص من هايبوكلورات الصوديوم ، ثم جففت العينات على ورق ترشيح معقم ثم زرعت في أطباق بتري تحوي على .P.D.A المحضر مسبقا بواقع 4 قطع و3 اطباق لكل عينة ، حضنت الأطباق في درجة حرارة 25±2 م لمدة 3 ايام ثم نقيت مستعمرة الفطر *Rhizoctonia solani* في اوساط زرعيه جديدة وشخص الفطر بمساعدة د. مجيد متعب ديوان و د. صباح لطيف علوان وبأتباع المفاتيح التصنيفية في Sinclair ، (32) و Parmeter و Whithey، (28)

الحصول على العوامل الاحيائية

فطر المقاومة الإحيائية *Trichoderma harzianum*

استعملت في هذه الدراسة العزلة الاسترالية للفطر *Trichoderma harzianum* كعامل مكافحة حيوية التي تم الحصول عليها من قسم وقاية النبات - كلية الزراعة /جامعة الكوفة من قبل الأستاذ الدكتور مجيد متعب ديوان

اما عزلتي البكتريا *Bacillus subtillis* و *Pseudomonas fluorescens* تم الحصول عليها من قسم وقاية النبات - كلية الزراعة /جامعة الكوفة من قبل الاستاذة الدكتورة صباح لطيف علوان ،

اختبــــار القــــدرة الامراضـــــية للفطــــر *Rhizoctonia solani* وفطـــر المكافحـــة الحيويـــة *Trichoderma harzianum* علـــى الوسط الزرعي P.D.A

صـبت الأطبـاق بالوسـط الزرعـي P.D.A ثــم زراعتهـا بـالفطر *R.s.* وذلـك مـن مزرعـة بعمـر 5 أيـام وبـثلاث مكـررات ثـم حضـنت الأطبـاق فـي درجــة حـــرارة (25±2)°م وبعــد 48 ســاعة زرعــت الأطبــاق ببــذور البيتونيــا بعــد تعقيمهــا بهــــايبوكلورات الصـــوديوم بتركيـــز 10% مـــن المحلـول التجـاري لمـدة دقيقتـين ثـم غسـلها بالمـاء المقطـر المعقـم مـرتين فـي كـل مـرة تتـرك البـذور فـي المـاء مـدة دقيقتـين ثـم تجفـف بوضـعها علـى ورقـة ترشـيح معقمـة بعـدها تمـت زراعـة البـذور فـي الأطبـاق البتريـة 10بـذرات فـي كـل طبـق علـى بعـد1سـم مـن حافـة الطبـق وبشـكل دائـري،ثم حسبت نسـبة الانبـات لكـل معاملـة بعـد سـبعة ايـام من الزراعة .

اختبـــار القـــدرة التضـــادية بـــين الفطـــر *Trichoderma harzianum* والفطــــر الممرض *Rhizoctonia solani* مختبريا .

اسـتعملت تقنيـة الـزرع المـزدوج Double culture technique فـي أطبـاق بتـري قطـر 9 ســم حاويـــة علــى الوســط الغــذائي .P.D.A المعقـم ، ولاختبـار القـدرة التضـادية للفطريـات المســتخدمة فـــي الدراســة اذ لقحــت حافــة كــل نصـف طبـق بقـرص قطـره 0.5 سـم مـن حافـة النمـــو القطـــري لمســـتعمرة كـــل مـــن الفطـــر الممـــرض *R.solani* ولقحــت حافــة النصــف الأخـر بقـرص مماثـل لفطـر المكافحـة الحيويـة *T.harzinum* الناميـــة علـــى الوســـط الغـــذائي .P.D.A وبعمــر 5 أيــام ، كــررت كــل معاملــة ثـلاث مـرات كمـا نفـذت معاملـة للسـيطرة وذلـك بتلقـيح مركـز القسـم الأول مـن الطبـق بـالفطر المعـزول المـذكور أعـلاه وفطـر المكافحـة الحيويـة فقـط وكـل علـى انفـراد (18). وحضـنت الأطبـاق جميعهـا فـي الحاضـنة بدرجـة حـرارة 25±2 مْ لمـدة 5 أيـام ، ثـم جـرى قيـاس معـدل النمـو القطـري لكـل مـن الفطـر الممـرض وفطـر المكافحـة الحيويـة باسـتخدام مسـطرة شـفافة، و تـم تقـدير درجـة التضـاد لكـل فطـر حسـب سـلم التقيـيس الخماسـي الـذي ذكـره Bell وآخـرون ( 16) وكما يأتي

الدرجة النمو (فطر المكافحة الحيوية)

1- الفطر المضاد يغطي الطبق بكاملة .
2- الفطر المضاد يغطي ثلثيمساحة الطبق .
3- الفطـر المضـاد والفطـر الممـرض كـل منهما يغطي نصف مساحة الطبق
4- الفطـر الممـرض يغطـي ثلثـي مسـاحة الطبق .
5- الفطر الممرض يغطي الطبق بالكامل .

وعليـه إذا كانـت درجـة التضـاد 2 أو اقـل فهـذا يعنـي أن فطـر المكافحـة الإحيائيـة فعـال ضـد الفطر الممرض.

اختبـار تـأثير المبيـد Thiophanate-Methyl (Topsen-M)70% فـي نمـو الفطـر الممـرض *Rhizoctonia solani* علـى وسـط P.D.A بعد 7 ايام من الزراعة

تـم تحضـير المبيـد بأخـذ 1 غـم \لتـر مـادة فعالـة واضـيف الـى 250 مـل مـن الوسـط الزرعـي

P.D.A وذلك لاختبار تأثيره على نمو الفطر الممرض *Rhizoctonia solani* اذ تم خلطه مع الوسط الزرعي P.D.A بصورة جيدة ثم صب الوسط في اطباق بتري وبعد تصلبها تمت تنمية الفطر وذلك بزراعته في مركز كل طبق وبواقع ثلاثة مكررات للتركيز المحضر اما معاملة المقارنة فقد تمت زراعة الفطر في وسط P.D.A خالي من المبيد وحضن في الحاضنة على درجة حرارة 25 ± 2 مْ لمدة 7 ايام حسبت اقطار المستعمرات للفطر *Rhizoctonia solani* حساب النسبة المئوية للتثبيط وفق المعادلة المذكورة

$$\text{\% للتثبيط} = \frac{\text{معدل النمو الفطري في المقارنة – معدل النمو الطري في المعاملة}}{\text{معدل النمو القطري في المقارنة}} \times 100$$

اختبار التوافق بين فطر المكافحة الأحيائية *T.harzianum* والمبيد الكيميائي Topsen- )Thiophanate-Methyl 70% M) - وحساب النمو الشعاعي و النسبة المئوية للتثبيط

تم إذابة الوسط الزرعي.P.D.A وترك ليبرد قليلا قبل إن يتصلب وأضيف للدوارق المبيد بمقدار الجرعة الموصى بها 1غم/ لتر ومزج بشكل جيد أما معاملة السيطرة فتركت دون إضافة مبيد، صبت الأوساط الحاوية على المبيد وكذلك معاملة السيطرة بمقدار20سم$^3$ لكل طبق وبعد تصلبها زرعت بفطر المكافحة الأحيائية *T. harzianum* من مزرعة عمرها عشرة أيام اذ أخذ قرص قطرة 0.5سم وزرع في وسط الطبق وبثلاثة مكررات لكل معاملة ،ثم حضنت في درجة حرارة 25±2$^o$م، وتم حساب النمو الشعاعي للفطر وذلك بعد \وصول نمو الفطر في معاملة السيطرة إلى حافة الطبق وتم اخذ معدل قطرين متعامدين من ظهر الطبق يمران بمركز القرص

أما لحساب النسبة المئوية للتثبيط أو التشجيع بحسب معادلة Abbot الواردة في شعبان والملاح، (8) .

$$\text{\% للتثبيط} = \frac{\text{معدل النمو القطري في المقارنة – عدل النمو الطري في المعاملة}}{\text{معدل النمو القطري في المقارنة}} \times 100$$

اما التشجيع تم حسابه حسب المعادلة ادناه :

$$\text{\% لتشجيع} = \frac{\text{معدل النمو القطري في المقارنة ـ عدل النمو الطري في المعاملة}}{\text{معدل النمو}} \times 100$$

القطري في المقارنة

اختبار القدرة التضادية بين انواع البكتيريا *Bacillus subtillis* و *Pseudomonas fluorescens* مع بعضها البعض

اخذت ثلاث اطباق بتري حاوية على الوسط الزرعي( Nutrient Agar (NA عمل في الوسط خطين متعرجين لكل منهما في مركز نصف الطبق وذلك بأخذ مسحة من المستعمرة البكتيرية بواسطة loop وعمل خط متعرج للبكتريا في وسط نصف الطبق والنصف لأخر عمل ايضا خط متعرج من البكتريا الاخرى ثم حضن بالحاضنة بدرجة 28 ±2 مْ لمدة 24 ساعة ثم يلاحظ ما اذا كان هنالك عدم وجود اي تضاد بين الانواع المذكورة.

اختبار تاثير انواع البكتيريا *Bacillus subtillis* و *Pseudomonas fluorescens* مع الفطر الممرض *Rhizoctonia solani* والتوافق مع فطر المكافحة الأحيائية *Trichoderma harzianum*

.تحضير وسط P.D.A وترك لحين أن يتصلب أضيف ( 0.1 ) مل من لقاح البكتريا للدورق الأول ومزج جيدا أما الدورق الثاني معاملة سيطرة فتركت بدون إضافة البكتريا ،صبت الأوساط الحاوية على البكتريا ومعاملة السيطرة بمقدار20غم لكل طبق ،وحضنت الأطباق في الحاضنه على درجة حرارة 30مْ ولمدة48 ساعة ثم تزرع بعدها بالفطر الممرض *R. solani* وفطر المكافحة الأحيائية *T.harzianum* قرص قطرة (0.5) سم باستعمال الثاقب الفليني وتحضن الأطباق في الحاضنة وعلى درجة حرارة (25±2) مº وعند وصول النمو إلى حافة الطبق في معاملة السيطرة تم قياس النمو القطري للفطر الممرض وفطر المكافحة الأحيائية وذلك بأخذ معدل قطرين متعامدين من ظهر الطبق يمران بمركز القرص وكما في المعادلة Abbot المذكورة سابقا.

تحضير لقاح الفطر الحيوي *Trichoderma harzianum* والفطر الممرض *Rhizoctonia solani*

بعد وصول نمو المستعمرة الفطر الممرض الى حافة الطبق اخذت ثلاث اقراص قطر كل قرص 5.0 ملم من كل طبق ووضعت في انابيب اختبار حجم 20 مل تحوي 9 مل ماء مقطر معقم وتم رج الاقراص بشكل جيد ،ثم اخذ من كل منها 1 مل واضيف الى انبوبة اختبار اخرى تحوي 9مل ماء مقطر معقم وهكذا تم عمل سلسلة من التخفيف وصولا الى التخفيف الخامس بحيث يصبح الحجم $10^{-5}$ وبعدها تم اخذ 1 مل من التخفيف الخامس واضيف الى وسط P.D.A قبل تصلبه

وتحريكـه حركـة موضـعية لكـي يحـل تجـانس جيـد للوسـط مـع الوحـدات التكاثريـة للفطـر ثـم حضـنت الاطبـاق بالحاضـنة بدرجـة حـرارة 25±2 مْ لمـدة 72 سـاعة ثـم حسـبت عـدد الوحـــدات التكاثريـــة للفطـــر (CFU )- Colony Unit Forming وفقـا لمعادلـة Clark ،(18) .

عــدد الوحـــدات التكاثريـــة /مـــل = عـــدد المستعمرات في كل طبق × مقلوب التخفيف

امــا بالنســبة للفطــر الحيــوي *T. harzianum*بعـد وصـول نمـو الفطـر الحيـوي الـى حافـة الطبـق تـم اخـذ ثـلاث اقـراص قطـر كـل قـرص 5.0 ملـم مـن كـل طبـق ووضـعت فـي انابيـب اختبـار حجـم 20 مـل كـل انبوبـة تحـوي 9مـل مـاء مقطـر معقـم وتـم رج الاقـراص بشـكل جيـد ،ثـم اخـذ مـن كـل منهـا 1 مـل واضـيف الـى انبوبـة اختبـار اخـرى تحـوي 9 مـل مـاء مقطـر معقــم وهكــذا تــم عمــل سلســلة مــن التخفيــف وصــولا الــى التخفيـف السـادس بحيـث يصـبح الحجـم $10^{-6}$ وبعـدها تـم اخـذ 1 مـل مـن التخفيـف الســادس واضــيف الــى وســط P.D.A قبــل تصـلبه وتحريكـه حركـة موضـعية لكـي يحـل تجـانس جيـد للوسـط مـع العـالق الجرثـومي ثـم حضـنت الاطبـاق بالحاضـنة بدرجـة حـرارة 25±2 مْ لمــدة 72ســاعة ثــم حســبت عــدد الوحــدات التكاثريــة للفطــر Colony Forming Unit (CFU ). وفقا المعادلة Clark . (18).

عــدد الوحـــدات التكاثريـــة /مـــل = عـــدد المستعمرات في كل طبق × مقلوب التخفيف

تشـخيص الفطريـات باسـتخدام تفاعـل البلمـرة المتسلسل (PCR)

اســتخلاص الحــامض النــووي منقــوص الاوكسجين (DNA) من الفطر المعزول

اســتخلص الحــامض النــووي (DNA) باســتخدام العــدة (Cat. No: FAPGK100)المجهــزة مــن قبــل شــركة فــافورجين (Favorgen) تــايوان- الصــين، و حسـب الخطـوات المـذكورة فـي الورقـة المرفقـة مع المنتج.

استخدام تقنيه تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

نفــذ تفاعــل البلمــرة المتسلســل بحجــم 20 مــايكروليتر و الحاويــة علــى 1 مــايكروليتر مــن كـل البـادئ الامـامي و الخلفـي (10 pomol) و1 مـايكروليتر مـن الحـامض النـووي (μl /μg 30). بعـد وضـع جميـع المكونـات المطلوبـة للتفاعـل فـي الانبوبـة المجهـزة مـن قبـل الشـركة المصــنعة و اكمــال الحجــم بالمــاء المقطــر اللاايـوني إلـى 20 مـايكروليتر، تـم مضـاعفة الحـامض النـووي للفطـر المعـزول باسـتخدام ظـروف تفاعـل البلمـرة المتسلسـل المبينـة فـي جدول (1) .

الترحيــل الكهربــائي باســتخدام الاكـــاروز الهلامــــي (Agarose gel electrophoresis)

حضـرت طبقـة هـلام الاكـاروز (agarose gel)بعـد اخـذ وزن 1 غـم مـن الاكـاروز و اذابتـه فـــي 100 مـــل مـــن المحلـــول الـــدارئ 1×TBE(Tris boric acid EDTA

(buffer و لحين تحول الخليط الى محلول رائق. اضيف 5 مايكروليتر من صبغة الـ Ethidium bromide بعد تبريد المحلول قبل التصلب جهز القالب الخاص بصب الاكاروز و الحاوي على المشط في إحدى نهاياته لعمل حفر داخل طبقة الجل، ثم صب الاكاروز المذاب و الحاوي على صبغة الـ Ethidium bromide و ترك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة. عند اكتمال تصلب طبقة الاكاروز، رفع المشط بحذر وأعيد القالب الى مكانه في جهاز الترحيل، ثم أضيف محلول TBE1× إلى حوض الترحيل (Electrophoresis tank) مغطيا طبقة الاكاروز بارتفاع 1 سم تقريباً.

اضيف 10 مايكروليتر من الـ DNA المضاعف بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل الى كل حفرة من حفر طبقة هلام الاكاروز. كما تم اضافة 5 مايكروليتر من معلم الحامض النووي DNA ladder DNAKbp 1 (marker) الى الحفرة الموجودة في الجانب الايسر من العينات المضافة لغرض تحديد احجام الحامض النووي المضاعف. أوصلت أقطاب الجهاز بالتيار الكهربائي و شغل مجهز الطاقة (Power supply) على 100 فولت. بعد اكمال عملية ترحيل العينات، فحصت طبقة هلام الجل الحاوية على حزم الحامض النووي تحت الاشعة فوق البنفسجية (UV trans illumination) و اخذت صور لها.

**جدول (1): خطوات وظروف تفاعل تضخيم السلسلة (PCR) المستخدمة لمضاعفة الحامض النووي للفطريات المعزولة .**

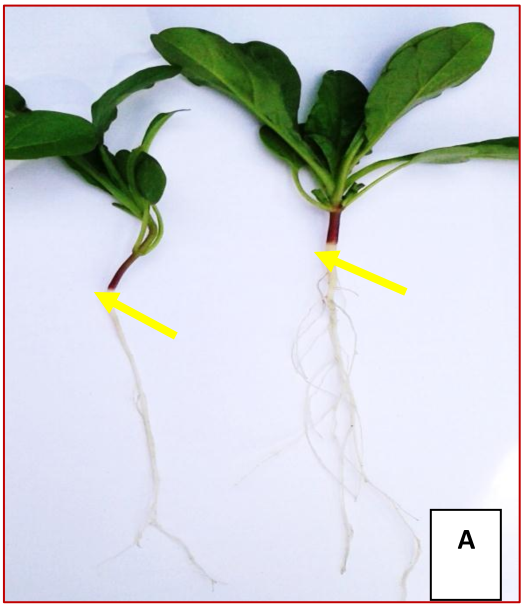
| خطوات تفاعل تضخيم السلسلة | درجة الحرارة المئوية (م°) | الوقت | عدد الدورات |
|---|---|---|---|
| Initial denaturation | 94 | 5 دقائق | 1 |
| Final denaturation | 94 | 30 ثانية | 35 |
| Annealing | 55 | 50 ثانية | |
| Initial extension | 72 | 1 دقيقة | |
| Final extension | 72 | 5 دقائق | 1 |
| Hold | 4 | | |

تحليـل تسلسـل قواعـد الحـامض النـووي (DNA) للعزلات الفطرية المعزولة

تـم مضـاعفة حـزم الحـامض النـووي DNA المسـتخلص مـن الفطريـات المعزولـة و بشـكل منفـرد و ارسـال نـواتج تفاعـل (PCR amplicons) البلمـرة المتسلسـل مـع البـوادئ الاماميـة و الخلفيـة التـي اسـتخدمت لمضـاعفة حـزم الحـامض النـووي الـى شـركة Macrogen الكوريـة لغـرض تحديـد تسلسـل القواعـد النايتروجينيـة للحـوامض النوويـة المضاعفة من العزلات الفطرية.

لتشـخيص الفطـر المعـزول، ادخـل تسلسـل الحـامض النـووي لكـل عزلـة فـي قاعـدة البيانـات المتـوفرة فـي المركـز الـوطني لمعلومـات التقنيـة الحيويـة (National Center for Biotechnology Information, NCBI) بأسـتخدام برنـامج الـ BLAST(Basic Local Alignment Search Tool، (34).

## النتـائج والمناقشة Results and Discussion



**صـورة (2) : صـورة لنبـات البيتونيـا توضـح الاتـي :** (A) السـهم يشـير الـى جـذور نبـات سليم- (B) السـهم يشير الـى جـذورنبات مصـاب بـالفطر *R.solani*و يلاحـظ فيهـا اسـوداد الشـعيرات الجذريـة ووجـود التخصـر فـي منطقـة التاج .

3 – 3 – اختبـار القـدرة الامراضـية للفطـر *R.solani* وفطـر المكافحـة الحيويـة *T.harzianum* في الوسط الزرعي P.D.A

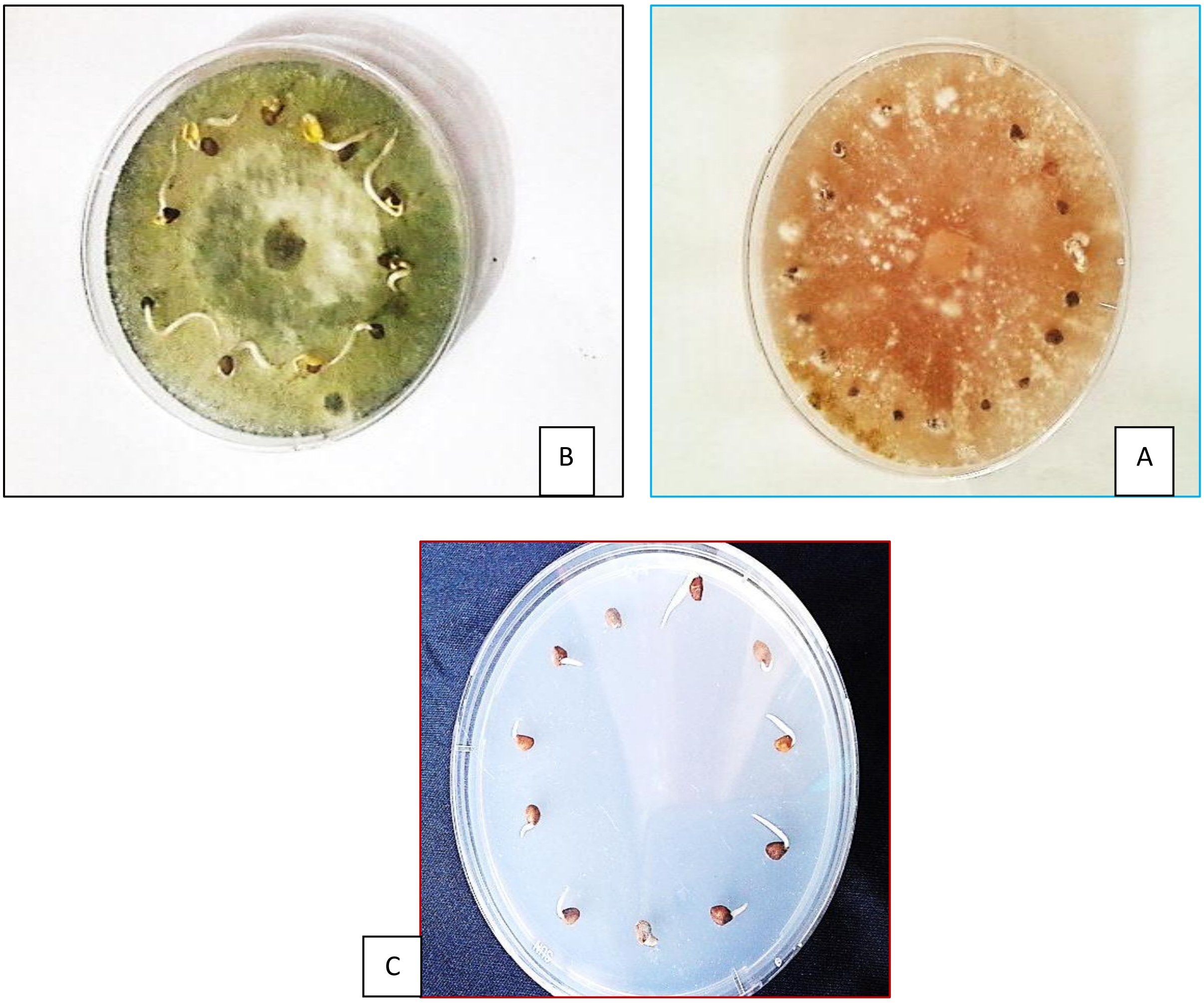
اتضـح مـن النتـائج ان اكثـر الفطريـات تـأثيرا فـي نسـبة أنبـات بـذور البيتونيـا كـان الفطـر *R.solani*، بينمـا لـم تقلـل فطريـات المقاومـة

الإحيائيـة مـن أنبـات البـذور إذ بلغـت نسـبة الإنبـات 100% كمـا فـي( الصـورة 3). إن سـبب زيـادة نسـبة البـذور المتعفنـة بفعـل الفطـر *R.solani* يعـود لطبيعتـه التطفليـة إذ يهـاجم بـذور العائـل مؤديـا إلـى تعفنهـا أو منعهـا مـن الإنبـات بـإفرازه بعـض المركبـات السـامة التـي تـؤدي إلـى قتـل الأجنـة وإفـرازه لعـدد مـن الأنزيمـات المحللـه للسـليلوز والكـايتين والبـروتين والتـي تسـبب تعفـن البـذور ، ويعـد الفطـر *R.solani* أحـد أهـم مسـببات تعفـن البـذور ومـوت البـادرات فـي العـالم ( 13) . ويتميـز كـذلك بـإفراز الأنزيمـات والسـموم الممرضـة للنبـات وقـد تـم تشـخيص العديـد منهـا وتنقيتهـا مثـل Phenyl acetic acid ومشـتقات هـذا الحـامض (5) ،و يفـرز الفطـر حـامض الأوكزاليـك الـذي يسـبب قتـل الخلايـا النباتيـة وتحفيزهـا علـى إنتـاج سـكريات وحـوامض أمينيـة ، و يعـد الفطـر *R. solani* مـن أسـرع المسـببات المرضـية قـتلاً للعائـل وإن هـذه الخاصـية درسـت مختبريـاً فوجـد أن هنـاك مجموعـة مـن الأنزيمـات لهـا علاقـة بـالفطر تسـاعد فـي تفكيـك جـدران الخلايـا كـأنزيم Pectinase والــــ Pectin methylledterase والـــ Cellulase والــــ Phosphatase (27 ،20). وتتفـق هـذه النتـائج مع العديـد مـن الدراسـات التـي أشـارت إلـى قـدرة الفطـر *R. solani* علـى تقليـل أعـداد بـذور اللهانــه النابتــة (9 ) . أمــا الفطــر *T. harzianum* يعمـل علـى إفـراز مـواد كيميائيـة حيويـة فـي البيئـة الخارجيـة تعمـل علـى تحفيـز الأنبـات وزيـادة نسـبته أو إن تلـك المـواد تعمـل علـى تآكـل الغـلاف الخـارجي للبـذرة ومـن ثـم تسـاعد علـى سـرعة الأنبـات وهـذا يتفـق مـع مـا ذكـره Kaveh وآخـرون (2011 ).او افـراز مـواد ذات تـأثير تحفيـزي علـى الأنبـات والنمـو مثـل Indole Acetic Acid (7 ) وهـذا مـا اكـده Dewan (19) و الموسـوي( 11 ). (الصورة 3).

اختبـار القـدرة التضـادية بـين فطـر المكافحـة الأحيائيـة *T. harzianum* والفطـر الممـرض *R. solani* علـى الوسـط الزرعـي .P.D.A فـي درجة حرارة 25±2 مْ

تـم دراسـة الخاصـية التضـادية لعامـل المقاومـة الإحيائيـة وفقـا لمقيـاس سـلم التقيـيس الخماسـي الـذي ذكـره Bell وSumner ، (17) Chitianse. وجـد ان الفطـر الحيـوي *T.harzianum* يـؤثر بصـورة كبيـرة علـى الفطـر الممـرض *R. solani* حيـث كـان الفطـر الممـرض اكثـر استعمار مـن قبـل الفطـر الحيـوي (21)، وفـي دراسـة اخـرى وجـد ان الفطـر الحيـوي *T.harzianum* اعطـى مقـدرة تضـادية عاليـة ضـد الفطـر الممـرض *R. solani* علـى الوسـط الزرعـي P.D.A المسـبب لمرض سقوط البادرات (10).

ان فطـر المقاومـة الحيويـة لـه قـدرة علـى انتـاج المضـادات الحياتيـة (15) و وجـد ان للفطـر الحيـوي قابليـة علـى انتـاج المضـادات الحيويـة مثـل Trichodermol و Trichodermin وGliotoxine و pachybasi وEmodin وChrysophancol (25).(الصورة 4)




**الصورة (3): اختبار القدرة الامراضية للفطر الممرض وفطريات المقاومة الأحيائية**

A– تمثل تاثير الفطر الممرض *R.solani* على انبات بذور البيتونيا .

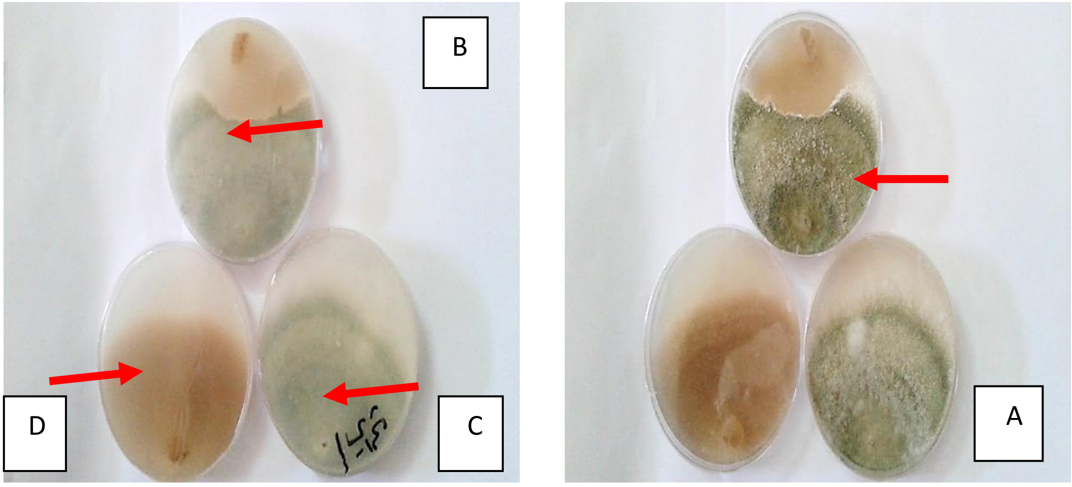
(B) تاثير فطر المقاومة الحيوية *T. harzianum* على انبات بذور البيتونيا.

(C) بذور البيتونيا (مقارنة).

**جدول (3): مقارنة بين نسب التشابه النيوكلوتيدي للفطر *R. solani* المعزول في هذه الدراسة و العزلات الاخرى العائدة لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).**

| Fungus | Isolate or strain name | Origin | The most similar sequences in Gen Bank database | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Gen Bank Accession Number | Sequence similarity (%) |
| *Rhizoctonia solani* | IQ34 | Iraq | KF372660.1 | 99 |
| *Rhizoctonia solani* | IQ40 | Iraq | KF372662.1 | 96 |
| *Rhizoctonia solani* | IQ35 | Iraq | KF372646.1 | 95 |
| *Rhizoctonia solani* | IQ49 | Iraq | KF372653.1 | 95 |
| *Rhizoctonia solani* | IQ23 | Iraq | KF372645.1 | 95 |
| *Rhizoctonia solani* | IQ30 | Iraq | KF372657.1 | 95 |
| *Rhizoctonia solani* | MML4001 | India | JX535004.1 | 95 |
| *Rhizoctonia solani* | RsolTeaIN1 | India | KJ466117.1 | 95 |
| *Rhizoctonia solani* | Rae354 18S | Taiwan | AY684921.1 | 93 |
| *Rhizoctonia solani* | BPRhi 01 | India | KM434130.1 | 93 |
| *Rhizoctonia solani* | RUPP93 18S | India | JF701784.1 | 93 |
| *Rhizoctonia solani* | RKNG9 | India | JF701745.1 | 91 |
| *Rhizoctonia solani* | RKLC1 | India | JF701742.1 | 91 |
| *Rhizoctonia solani* | RKNM3 18S | India | KC997793.1 | 91 |
| *Rhizoctonia solani* | RKNM8 | India | JF701744.1 | 90 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Rhizoctonia solani* | RDLM6 | India | JF701717.1 | 90 |
| *Rhizoctonia solani* | RS35 | India | KU574260.1 | 90 |
| *Rhizoctonia solani* | RT 5-3 18S | USA | FJ746908.1 | 88 |
| *Rhizoctonia solani* | CHR09-19 18S | China | HQ270173.1 | 88 |
| *Rhizoctonia solani* | RT 8-2 18S | USA | FJ746916.1 | 88 |
| *Rhizoctonia solani* | RT 8-3 18S | USA | FJ746917.1 | 88 |
| *Rhizoctonia solani* | RT 5-1 18S | USA | FJ746906.1 | 88 |




**الصورة (4):اختبار القدرة التضادية لفطر المكافحة الأحيائية *Trichoderma harzianum* والفطر الممرض *Rhizoctonia solani* على الوسط الزرعي .P.D.A في درجة حرارة 25±2 م**

(A)–السهم يشير الى منطقة التضاد من الجهة الخلفية للطبق بين الفطر الحيوي *Trichoderma harzianum* والفطر الممرض *Rhizoctonia solani* .

(B)- السهم يشير الى منطقة التضاد من الجهة الامامية للطبق بين الفطر الحيوي *Trichoderma harzianum* والفطر الممرض *Rhizoctonia solani* .

(C) السهم يشير الى الفطر الحيوي *Trichoderma harzianum* (مقارنة ) .

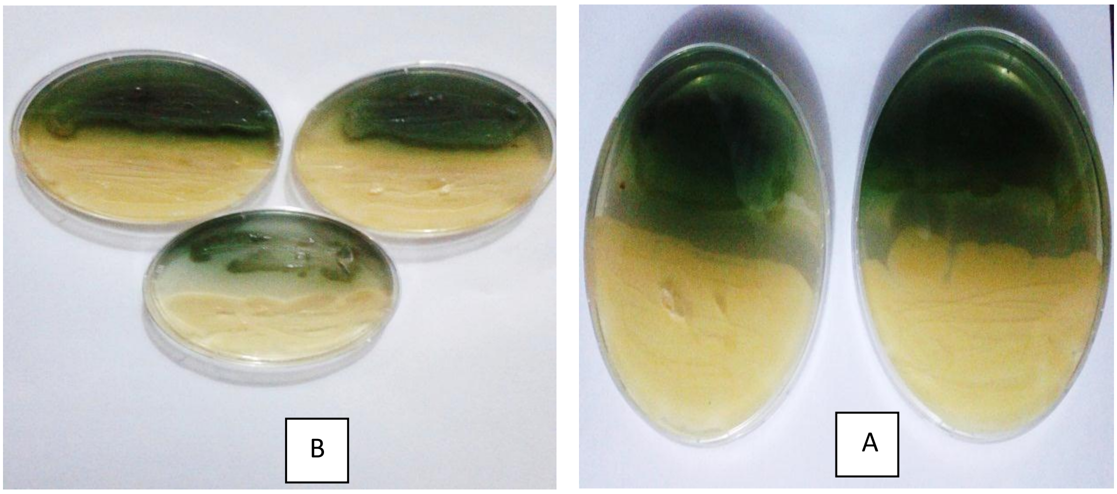
(D) السهم يشير الى الفطر الممرض *Rhizoctonia solani* (مقارنة)

اختبــار القــدرة التضـــادية بــين انــواع البكتيريــا *Bacillus subtillis* و*Pseudomonas fluorescens*

اوضــحت النتــائج عــدم وجــود تضــاد بــين بكتريــا *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtillis*، حيــث لــم يــؤثر نمــو البكتريـــا المـــذكورة اعـــلاه فـــي نمـــو البكتريـــا المجـاورة لهـا فـي الطبـق نفسـه. تتفـق هـذه النتـائج مع الياسري(12) .(الصورة 5) .

**جدول (2): تأثير نوعي البكتريا *P. fluorescens* و*B. subtillis* على النمو الشعاعي للفطر الممرض *R . solani* والتوافق مع فطر المقاومة الإحيائية *T. harzianum***

| المعاملات | قطر المستعمرة | % للتثبيط |
|---|---|---|
| *T. harzianum* | 9 | 0 |
| *R. solani* | 9 | 0 |
| *B. subtillis* | 9 | 0 |
| *P. fluorescens* | 9 | 0 |
| *T. harzianum + B. subtillis* | 8.7 | 3.33 |
| *T. harzianum + P .fluorescens* | 8.85 | 1.66 |
| *R. solani+ B. subtillis* | 0.50 | 94.44 |
| *R. solani + P. fluorescens* | 0 | 100 |
| L.S.D | 1.500 | 1.224 |




**الصورة (5) :اختبار القدرة التضادية بين انواع البكتيريا *B. subtillis* و*P. fluorescens* المدروسة في الاطباق**

A– السطح العلوي للتضاد بين نوعي البكتريا *B. subtillis* و*P. fluorescens* المدروسة في الاطباق

B- السطح السفلي للتضاد بين نوعي البكتريا *B. subtillis* و*P.fluorescens* المدروسة في الاطباق

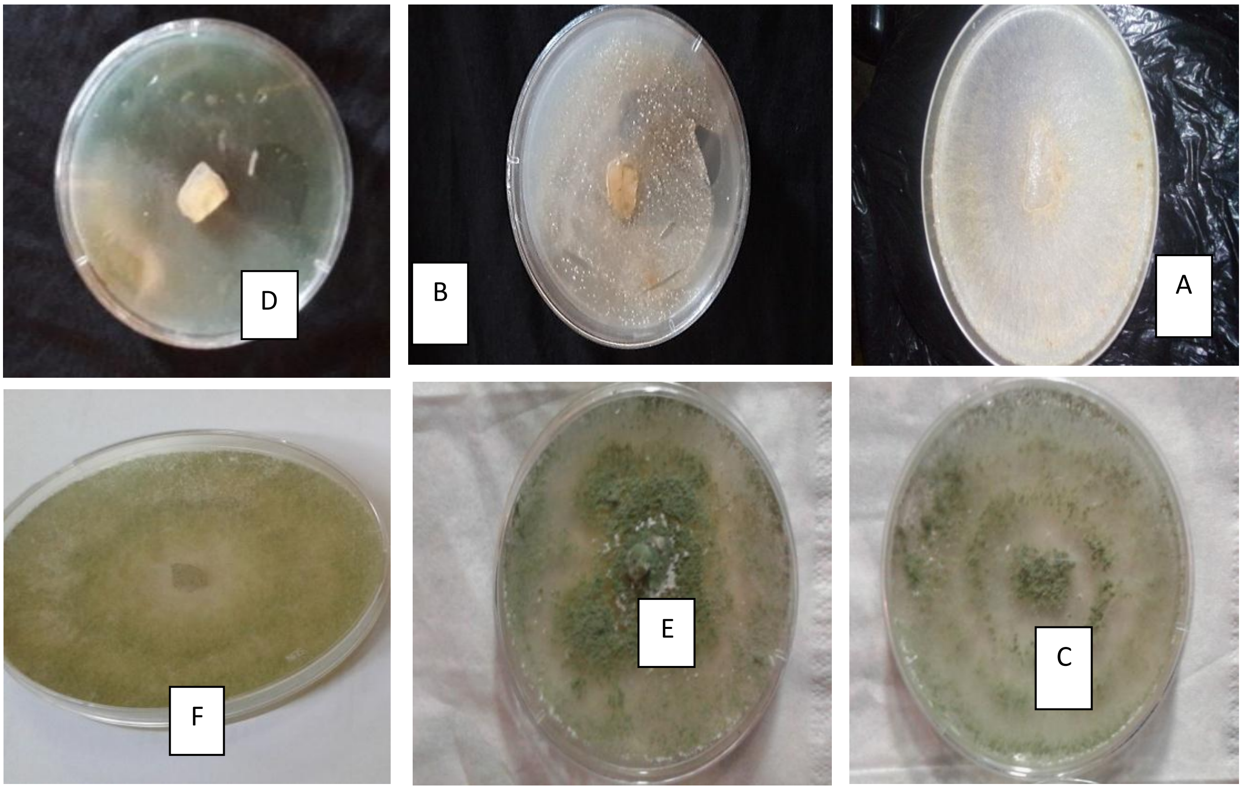
اختبار تأثير نوعي البكتريا *P.fluorescens* و*B. subtillis* على النمو الشعاعي للفطر الممرض *R. solani* والتوافق مع فطر المقاومة الإحيائية *T. harzianum*

اتضح من النتائج في جدول (2) تفوق معاملة *R. solani* + *P.fluorescens* في نسبة التثبيط للفطر الممرض في الاطباق على جميع المعاملات اذ بلغت 100 % تلتها معاملة *R. solani*+ *B. subtillis* والتي اعطت نسبة 94.44 % ، مقارنة مع معاملة المقارنة ( *R. solani* ) التي بلغت نسبة التثبيط فيها 0.0 % (جدول 7، ) . وأوضح Kataria وآخرون (22) ان التأثير الفعال للبكتريا *P.fluorescens* في كبح مرض سقوط البادرات قبل وبعد البزوغ على الفاصوليا والخيار المتسببة عن الفطر *R.solani* وعللوا سبب التثبيط إلى امتلاك البكتريا القابلية على إنتاج حامض 5-nitrosalicylic acid و 2-aminoisobutyric acidو 2,6dichloroisonicotinic acidو ascorbic acid 0-acetylsalicylic acid و benzoic acid و gluconic acid و licheninوغيرها من المواد المثبطة لنمو الفطر الممرض .اما بالنسبة الى البكتريا *B.subtilis* فقد تعود القدرة التضادية العالية لها إلى أنتاجها للمضادات الحياتية الببتيدية ذات القدرة العالية على كبح نمو الفطر *R. solani* في الوسط الزرعي PDA مثل subtiline و bacitracin و bacillin وA Iturin و surfactin أو أنتاجها لبعض

الأنزيمات المحطمة لجدران الخلايا الفطرية مثل endochitinase ، protease ، B-1,3-glucanase (26) .

اما بالنسبة لفطر المقاومة الحيوية فأظهرت النتائج ان المعاملة *T. harzianum + B. subtillis* تفوقت على معاملة*harzianum* . *P.fluorescens + T* اذ بلغت نسبة التثبيط 3.33 و 1.66 % على التوالي مقارنة بمعاملة المقارنة التي بلغت 0. 0 % . كما موضح في الجدول (3).

اثبتت نتائج جدول (3) ان عزلة الفطر *R. solani* المعزولة في هذه الدراسة ذات تشابه وراثي بلغ 99% مع العزلات العراقية ( Accession NoKF372660.1)، في حين كانت اكثر اختلافا وراثيا مع عزلات الفطر *R. solani* المعزولة من امريكا (Accession No FJ746906.1. , FJ746917.1, FJ746916.1 , FJ746908.1 ) و والصين (Accession No.HQ270173.1). كما اظهرت العزلات الاخرى و المشخصة سابقا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) تباينا وراثيا تراوح بين 90-95%. يتبين من خلال مقارنة نتائج هذه الدراسة مع ما متوفر من البيانات في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) ان الفطريات *F. verticilliodes* و *F. proliferatum* و*R. solani* المعزولة في هذه الدراسة هي سلالات جديدة شخصت في هذه الدراسة لأول مرة عالميا. ارسلت جميع التتابعات النيوكلوتيدية الى المركز المذكور اعلاه لايداعها تحت ارقام الادخال (GenBank Accession Numbers)KX828175و KX828174و KX828173، على التوالي وبأسماء الباحثين.




**الصورة(6): تمثل تاثير نوعي البكتريا على نمو فطر المقاومة الحيوية *T. harzianum*والفطر الممرض *R. solani* في الاطباق .**

(A)– الفطر الممرض *R. solani* (مقارنة) .

(B)– تاثير البكتريا *B. subtillis* على الفطر الممرض *R. solani* .

(C)– تاثير البكتريا *P. fluorescens* على الفطر الممرض *R. solani*.

(D)– فطر المقاومة الحيوية *T. harzianum* .

(E)– تاثير البكتريا *B. subtillis* على فطر المقاومة الحيوية *T. harzianum*.

(F)– تاثير البكتريا *P. fluorescens* على فطر المقاومة الحيوية *T. harzianum*

**المصادر References**

**1-** جبر ،كامل سلمان .2006. اول تسجيل للفطري *R. solani* و*Scytalidium* sp المسببين لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان نباتات الجربرا في العراق .مجلة العلوم الزراعية،37 : 133-140

**2-** الجلبي . سامي ونسرين خليل الخياط .2013 . نباتات الزينة في العراق .الدار الجامعية للطباعة والنشر والترجمة . كلية

الزراعـــة . جامعـــة بغـــداد . وزارة التعلـــيم العـالي والبحـث العلمـي . جمهوريـة العـراق .

3- حســون ،ابــراهيم خليــل .2005. المكافحــة البايولوجيـة والكيميائيـة لمسـبب مـرض تقـرح سـاق البطاطـا.Rhizoctonia Kuhn solani اطروحـــة دكتـــوراه. كليـــة الزراعـــة. جامعة بغداد . جمهورية العراق .

4- الخفـــاف ، ألاء عبـــد علـــي .2006. مقاومــة مــرض مــوت بــادرات الخيــار المتســـــبب عـــــن الفطـــــر *aphanidermatum(Edson)Fitz Pythium* بالمبيـــدين الحيـــويين فلوراميـــل والباســـلين والمبيـــد الكيميـــائي بيلتـــانول ودورهمـا فـي تحسـين صـفات النمـو والانتـاج. أطروحـة دكتـوراه. كليـة التربيـة للبنـات. جامعة الكوفة. جمهورية العراق .

5- دكســـون ع . ب . 1993. أمـــراض محاصـــيل الخضـر ترجمـة . عبـد النبـي محمـد أبـو غنيـة ، صــــالح مصــــطفى النويصــــري . الــــدار العربية للنشر والتوزيع . بيروت . لبنان .

6- الـراوي ،خاشـع محمـود وعبـد العزيـز محمـد خلــــف الله .2000 . تصــــميم وتحليــــل التجـارب الزراعيـة. كليـة الزراعـة. الطبعـة الثانيـــة . جامعـــة الموصـــل. وزارة التعلـــيم العالي والبحث العلمي. جمهورية العراق.

7- الركـابي ، فـراس علـي أحمـد. 2008. تـأثير مستخلصــــات النمــــو الخضــــري لــــبعض الأدغـال علـى الفطريـات المرضـية لجـذور الطماطـة علـى فطـر المقاومـة الأحيائيـة *T.* Rifai *harzianum*. رســالة ماجســتير .كليـة الزراعـة . جامعـة الكوفـة . جمهوريـة العراق .

8- شــعبان ، عــواد ونــزار مصــطفى المــلاح .1993. المبيـــدات . مؤسســـة دار الكتـــب للطباعـــة والنشـــر. جامعـــة الموصـــل . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . العراق .

9- العيسـاوي ، ذيـاب عبـد الواحـد فرحـان . . 2006عـــزل وتشـــخيص بعـــض الفطريـــات المرافقـة لمـرض مـوت بـادرات وتعفـن جـذور الرقــــي ومقاومتهـــا بـــالطرق الاحيائيـــة والكيميائيـــة. رســـالة ماجســـتير ، الكليـــة التقنية/المسيب ، جمهورية العراق .

10- العيســاوي، جاســم محمــود عبــد فــراس . 2010 . المكافحــة المتكاملــة لمــرض ســقوط البـــادرات علـــى الباذنجـــان المتســـبب عـــن الفطـــر *Rhizoctonia solani Kuhn*.رســالة ماجســتير. كليــة الزراعـــة . جامعة بغداد . جمهورية العراق .

11- الموســـوي، كـــريم عبـــد ياســـين .2005. دراســة الفطريــات المصــاحبة لحبــوب الــذرة الصـفراء *Zea mays* L وبـذور زهـرة الشـمس *Helianthus annuns* L فـي العــراق ، أطروحــة دكتــوراه ، كليــة العلــوم، جامعة البصرة. جمهورية العراق .

12- الياســـري ،حـــوراء عبـــاس اســـماعيل . 2016 . اســـــتخدام الطـــــرق الجزيئيـــــة والمناعيـة والنباتـات الكاشـفة فـي تشـخيص فـايروس موزائيـك الخيـار CMV واسـتحثاث المقاومـــة فـــي نباتـــات الخيـــار باســـتخدام

البكتريـا المحفـزة للنبـات . رسـالة ماجسـتير . كليــة الزراعــة . جامعــة الكوفــة . جمهوريــة العراق .

**13-** Agrios , G. N. 2007 . Plant Pathology . 4th Ed .. Academic Press. New York USA . pp. 606

**14-** Agrios , G. N. 1997 . Plant Pathology . 4th Ed .. Academic Press , New York

**15-** Ainizzati , M. Z. and F. Abdullah.2008. . Disease suppression in *Ganoderma* – infected oil palm seedlings treated with *Trichoderma harzianum* . Plant Protected Science , 44 :101 – 107 .

**16-** Bell, D. K; H. D. Welles and Markham C.R.1982. The in vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, 72: 379-382.

**17-** Bell, D.K. and D.R. Sumner, 1987. Survival of *Rhizoctonia solani* & other soil borne basidiomycetes in fallow soil . Plant Dis ; 71:911-915. India .

**18-** Clark,F. 1965. Agar- Plantes Method for total Microbial (C.F; Black, .(1965). Methods of soil analysis part 2 publisher madeson, Wisconsin, USA. pp1572 ) .

**19-** Dewan,M.M.1989. Identity And Frequency Of Occurrence Of Fungi In Root Of Wheat and Rye Grass And Their Effect On Take-All And Host Growth Ph .D Thesis University. West Australia. Australia. Pp210.

**20-** Dillard, H.R. 1987 . Characterization of isolates of *Rhizoctonia solani* from lima bean grown in New York State. Phytopathology, 77: 748-751.

**21-** Dolatabadi , K.H; E.M. Goltapeh; A. Varma and Rohani, N. 2011.Evaluation of arbuscular mycorrhizal – like fungi and *Trichoderma* species against soil borne pathogen . Journal of Agricultural Technology,7(1): 73-84.

**22-** Kataria, H.R. ; B. Wilmsmeier and Buchenauer, H. 1997. Efficacy of resistanse inducers , free – radical scavengers and an antagonistic strain of *Pseudomonas fluorescens* for

control of *Rhizoctonia solani* AG-in bean and cucumber. Plant Pathology, 46: 879 -909.

**23-** Kaveh, H; V. J. Safieh; A. Hossein and Morteza, M. 2011.Would *Trichoderma* Affect Seed Germination and Seedling Quality of Two Muskmelon Cultivars, Khatooni and Qasri and Increase Their Transplanting Success . Iran .J. Biol.Environ. Sci.,5: 169-175.

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

**25-** Kuguk, C. M and K. Kivang. 2002. Isolation of *Trichoderma* spp determination of their antifungal , biochemical and physiological featurd . Turky , J. Biol ; 27:247-253.

**26-** Montealegre, J. R; R. Reyes; L.M. Perez; R. Herrera; P. Silva and Besoain, X. .2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Environ. Biotchnol., 6: 1-8.

**27-** Murphy , J. B; J. McFerran and Good, M.J.1984. The effect of genotype and ethephon on *Rhizoctonia* soil rot of processing tomatoes: HortScience, 19:676-677.

**28-** Parmeter , J. R. and H..S. Whitney , .1970. Taxonomy and Nomenclature of the Imperfect State in : *Rhizoctonia solani* Biology and Pathology. (ed.). JR. Parameter. University of California Barkely. Los Angeless. USA. pp7-19.

**29-** Rai .V.R, and T. Mamatha .2005. Seeddling diseases of some important forest tree species and their management . http : // www , Metla . C . F . julkaisut / working papers . 2005 . m WPoll . htm . education in incidence of *Rhizoctonia solani* in tomato. Egyptian ) .

**30-** Robbins, J.A. and W. M. Colt. 2008. Herbaceous Ornamentals. The Idaho Master Gardener Program Handbook (IDAHO), Chapter 18: pp. 29. Role in

Pea (*Pisum Sativum*) Seedling vigor and associated phenolic content by extracts of apple pomace fermented with *Trichodema* spp. Process Biochemistry, 36 (1 - 2): 79 - 84.

Disease Management. Research Journal of Nanoscience root colonizing *Pseudomanas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annul Rev. Phytopathol. , 41 : 117 – 153.

**31-** Saad, M.M..2006. Destruction of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici* causing Tomato root- rot by *Pseudomonas fluorescens* Lytic enzymes . Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. ; 2(6) :274 -281.

**32-** Sinclair, J. B. 1982. Compendium of Soybean Disease 2nd ed. American phytopathologyical . pp. 104 Soc. St. Paul. MN. USA.

**33-** William W. W; K. Mackey and P. Chomczynski . 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity . Biotechniques 22 : 474 – 481.

**34-** Zheng, Z. X. K. and Shetty.2000. Enhancement of

# effect of some biological and chemical agents in controlling of the Disease of rot roots of the *Petunia Hybrida* plants by *Rhizoctonia solani*

Muntadher Muhsin Kadhim Aljanabi Fadhal Al – Fadhal
Department of Plant Protection- Faculty of Agriculture - University of Kufa - Republic of Iraq

**Abstract**

This study was conducted to evaluate the efficiency of some biological and chemical agents in controlling petunia root-rot caused by *Rhizoctonia solani*. Results showed that *R. solani* has high pathogenicity on petunia seeds in Petri dishes that resulted in 100% seed decay. The effect of some biological and chemical agents and the interaction between each other in controlling *R. solani* were studied. *Trichoderma harzianum* had inhibited the pathogenic fungus with 2 cm inhibition zone while *Pseudomonas fluorescens* completely inhibited *R. solani* compared to 94.44% inhibition rate resulted from *Bacillus subtilis*. The fungicide Topsin-M on the other hand resulted in complete inhibition when used at recommended dose. The pathogenic *R. solani* and its isolates were diagnosed using polymerase chain reaction PCR. However, the diagnosis showed that *R. solani* record for the first time in Iraq on petunia.

Keywords: *Petunia Hybrida*، *Rhizoctonia solani*

---

Part of M.Sc thesis of the first author