التشخيص الجزيئي للفطريات الممرضة *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen و *Rhizoctonia solani* Kühn و مقاومتها احيائيا بأستعمال الفطر *Trichoderma harzianum* Rifai

كريم عبدالحسين ردام الشجيري
المعهد التقني-المسيب-جامعة الفرات الاوسط

الخلاصة:

نفذت هذه الدراسة في كلية الزراعة-جامعة كربلاء بهدف عزل و تشخيص الفطرين الممرضين *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici* و *Rhizoctonia solani* بأستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction, PCR) و تحديد التتابع النيوكلوتيدي لحزم الحامض النووي المضاعفة و كذلك مقاومتها باستعمال فطر المقاومة الاحيائية *Trichoderma harzianum* و بعض التراكيب الوراثية لنبات الطماطة (Ginan، Wardeh، Gazalah و Selmoren). اثبت تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و تحليل التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي المضاعفة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و باستخدام برنامج BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ان الفطريات المشخصة هي *F. oxysporium* f. sp. *lycopersici* و *R. solani*. كما وجد من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي مع البيانات المتوفرة في قاعدة المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (National Center for Biotechnology Information, NCBI) ان سلالة الفطر *R. solani* المشخصة هي غير معروفة سابقا و قد تم تسجيلها في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) تحت رقم الادخال KY283953.

اظهر الفطر *T. harzianum* قدرة تضادية عالية في خفض معدلات نمو الفطرين *R. solani* و *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* و التي اختلفت بفارق معنوي عن معاملة المقارنة التي وصلت فيها نمو الفطرين الممرضين الى 9.00 و 6.36سم، على التوالي. كما وجد ان هجين الطماطة Selmoren بين الهجن الاخرى (Ginan، Wardeh و Gazalah) المستعملة في التجربة اكثر حساسية للفطريات الممرضة، في حين اظهر هجين الطماطة Ginan الاكثر مقاومة للفطريات *R. solani* و *F. oxysporium*f.sp. *lycopersici*.

Molecular identification of the pathogenic fungi *Fusarium oxysporium* f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen and *Rhizoctonia solani* Kühn and their biological control using the fungus *Trichoderma harzianum* Rifai

Summary:

This study was conducted at the College of Agriculture- Karbala University with the aim of isolating and identifying the pathogenic fungi *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici* and *Rhizoctonia solani* using the polymerase chain reaction (PCR) and determining the nucleotide sequence of PCR-amplified products, as well as their resistance using the biological control fungus *Trichoderma harzianum* and some tomato genotypes (Ginan،Wardeh، Gazalah and Selmoren).

Results, obtained from the PCR amplification and analysis of nucleotide sequence of PCR-amplified products and using BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool), had proven that the isolated pathogenic fungi are belonged to *F. oxysporium* f. sp. *lycopersici* and *R. solani*. From the comparison between the nucleotide sequences obtained from the identified fungi and the nucleotide sequences belonged to the same fungi and available at NCBI, it was revealed that the identified fungal strain of *R. solani* was not previously recorded at the National Center for Biotechnology Information (NCBl), therefore; the identified sequence of *R. solani* has been deposited and recorded in the GenBank database (NCBI) under the accession number KY283953.

It was also showed that the fungus *T. harzianum* had high antagonistic potential to significantly inhibit the pathogens *R. solani* and *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici*, on PDA medium, which differentiated significantly, compared to the control treatment when the fungal growth reached 9.00 and 6.36 cm, respectively. Among the other tested tomato genotypes, representing Ginan ، Wardeh،Gazalah and Selmoren, the tomato hybrid "Selmoren" was found to be highly susceptible to the pathogenic fungi; whereas the Ginan tomato hybrid was more resistant to *R. solani* and *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* among the other used genotypes.

المقدمة

تعد مشكلة أمراض النبات المتسببة عن بعض الفطريات الممرضة مثل *Rhizoctonia solani* و *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici* من المشاكل الخطيرة التي تواجه المزروعات و لاسيما محاصيل الخضر و منها محصول الطماطة (*Solanum lycopersici* Mill) (Singh، 2005; Mokhtar و Dehimat، 2014; Akrami و Yousefi، 2015). استخدمت العديد من الطرق لمقاومة هذه المسببات المرضية منها استخدام المبيدات الكيميائية باعتبارها الطريقة الاسرع لتحجيم الأضرار الناجمة عنها و لكن بسبب الضغط الانتخابي الناتج عن تكرار الاستخدام لهذه المبيدات الكيميائية أدى إلى ظهور صفه المقاومة فيها (Taylor و اخرون، 2002)، فضلا عن الحاجة الملحة لدى المستهلك بوجود منتجات زراعية خالية من متبقيات السموم و ما تسببه تلك المبيدات من مخاطر في صحة الإنسان و الحيوان و البيئة (Hiluf، 2015). و لهذا برزت أهمية استخدام بعض الاحياء المجهرية و منها الفطر *Trichoderma harzianum* الذي اثبت كفاءتة في مقاومة العديد من المسببات المرضية و منها الفطر *R. solani* و *F. oxysporium* و غيرها.

من جانب اخر، يعتبر اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من الاختبارات الدقيقة جدا و السريعة في تشخيص الكائنات الحية و منها الفطريات النباتية (Fang و Ramasamy، 2015). تهدف هذه التقنية الى مضاعفة منطقة محددة من الحامض النووي (DNA) المرغوب مضاعفته من تراكيز واطئة جدا الى ملايين من النسخ لنفس القطعة المستهدفة في جينوم الكائن الحي (Cai و اخرون، 2014). استخدمت هذه التقنية في تشخيص العديد من مسببات امراض النبات و منها الفطريات (Romberg و Davis، 2007 و Alaei و اخرون،2012، Arif و اخرون،2012).

نظرا للاهمية الاقتصادية لمحصول الطماطة و الاضرار الناجمة عن للفطريات الممرضة، فقد هدفت هذه الدراسة الى تشخيص الفطريات *R. solani* و *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* جزيئيا و كذلك معرفة كفاءة الفطر *T. harzianum* في حماية بذور و نباتات اربعة تراكيب وراثية من الطماطة من الاصابة بالفطريات المذكورة اعلاه .

المواد وطرائق العمل (Materials and Methods)

مصدر الفطريات المستعملة في الدراسة

تم الحصول على الفطر *T. harzianum* من مختبر الدراسات العليا في كلية الزراعة-جامعة الكوفة و المشخصة سابقا من قبل أ. د. مجيد متعب ديوان. كما تم الحصول على عزل من الفطريات *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* و *R. solani* من احدى مزارع الطماطة الواقعة في المنطقة الصحراوية في محافظة كربلاء، اما الفطر *R. solani*. جلبت بعض النباتات المصابة إلى المختبر و قطعت جذورها و قواعد سيقانها إلى قطع صغيرة وغسلت بالماء الجاري لإزالة الأتربة العالقة بها ثم عقمت بمحلول هايبو كلورايت الصوديوم (1%) لمدة دقيقتين و بعدها غسلت بماء مقطر معقم ونشفت بورق ترشيح لإزالة الماء الزائد منها. زرعت القطع النباتية في أطباق بتري حاوية على وسط البطاطا دكستروز Potato Dextrose (Agar, PDA المضاف إليه المضاد الحيوي كلورام فينكول (Chloramphenicol) بتركيز 200 ملغم/ لتر. وضعت الإطباق في الحاضنة في درجة حرارة 25±2 ْم لمدة 3 أيام ثم ظهر نمو الفطر قز *R. solani* و جرى تنقيته على نفس الوسط الغذائي بإتباع طريقة طرف الهايفا (Hyphal Tip). اختبرت القدرة الامراضية على بذور الطماطة (صنف Money Marker) بإتباع الخطوات المتسلسلة لفرضيات كوخ للتأكد من المسبب المرضي (الكعبي و اخرون،2009). شخصت الفطريات الممرضة باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و و تحديد تتابع القواعد النايتروجينية (Nucleotide sequence) وفق طريقة العمل الموصوفة لاحقا.

التشخيص الجزيئي للفطرين الممرضين *F. oxysporium* f.sp.*lycopersici* و *R. solani*

استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA) و تقدير تركيز و نقاوة مستخلص الحامض النووي DNA

استخلص الحامض النووي (DNA) للفطريات المعزولة باستخدام العدة (Cat. No: FAPGK100) المجهزة من قبل شركة فافورجين (Favorgen) تايوان-الصين.

تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

اجري اختبار تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام العدة (PCR PreMix, Cat. No. K-2012) المجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية المنشأ. نفذ تفاعل البلمرة المتسلسل بحجم 20 مايكروليتر و الحاوية على 1 مايكروليتر من كل البادئ الامامي(TCCGTAGGTGAACCTGCGG : ITS1) و الخلفي (TCCTCCGCTTATTGATATGCI :TS4) و1 مايكروليتر من الحامض النووي. وضعت جميع المكونات المطلوبة للتفاعل في الانبوبة المجهزة من قبل الشركة المصنعة و اكمال الحجم بالماء (Nuclease free water) إلى 20 مايكروليتر، تم مضاعفة الحامض النووي للفطر المعزول باستخدام ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل المبينة في جدول (1).

جدول1: خطوات و ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) المستخدمة لمضاعفة الحامض النووي (DNA) للفطر المعزول.

خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل	درجة الحرارة (م°)	الوقت	عدد الدورات
مسخ الـ DNA الاولي	94	5 دقائق	1
مسخ الـ DNA النهائي	94	30 ثانيه	35
ارتباط البادئ	50	50 ثانيه	
استطالة البادئ	72	1 دقيقة	
استطالة البادئ النهائية	72	5 دقيقة	1
Hold	4		

و بعد انتهاء عملية التضخيم اجريت عملية ترحيل النواتج بواسطة طريقة الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) و باستعمال طبقة الهلام (Agarose gel) بتركيز 1% للكشف عن الحامض النووي المضاعف و بفولتية 100 ملي امبير. و ترك لحين سريان الحامض النووي المعلم (DNA ladder marker) و الحامض النووي المضاعف. بعد اكتمال الترحيل، وضعت طبقة هلام الاكاروز تحت الاشعة فوق البنفسجية (Ultraviolet light) لملاحظة الـ DNA المتداخلة مع صبغة الايثيديم بروماید (Ethidium bromide) و اخذت صورة لها.

تحليل تسلسل قواعد الحامض النووي (DNA) للفطريات الممرضة

تم ارسال نواتج الحامض النووي (PCR amplicons) المضاعفة من الفطريات المعزولة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) الى شركة Macrogen الكورية لغرض تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية للحوامض النووية (Nucleotide sequence) و بالاتجاهين الامامي و الخلفي للنواتج المضاعفة من العزلات الفطرية. حللت التتابعات النيوكلوتيدية باستخدام برنامج (Basic Local Alignment Search Tool) BLAST لمقارنتها مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية National Center for Biotechnology (Information, NCBI) و العائدة لنفس العزلات الفطرية المستعملة في هذه الدراسة.

إكثار لقاح الفطريات

حضر لقاح الفطريات *T. harzianum* و *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* و *R. solani* باستعمال بذور الدخن المحلي (*Panicum millaceum* L.)، إذ نقعت البذور بالماء لمدة ساعة واحدة ثم غسلت جيداً لإزالة الأتربة و الشوائب منها ثم وضع كل 50 غم منها في دورق زجاجي حجمه 500 مل وعقم في جهاز الموصدة (Autoclave) في درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/ أنج^2 لمدة ساعة واحدة ثم أعيدت عملية التعقيم في اليوم التالي تحت نفس درجة الحرارة و الضغط والوقت المذكورين اعلاه. بعد انخفاض درجة الحرارة لقح كل دورق بأربعة أقراص قطر كل منها 0.5 سم من وسط البطاطا سكروز اكر(Potato Dextrose Agar, P.D.A) النامية عليه الفطر التضادي والفطريات الممرضة و بشكل منفرد مع ترك دورق بدون تلقيح كمعاملة مقارنة. حضنت جميع الدوارق في درجة حرارة 25 ± 2° م لمدة 10 أيام اخذين بنظر الاعتبار رج الدوارق كل 3-2 يوم لتوزيع الفطر على جميع البذور(Dewan، 1989). حفظ اللقاح في الثلاجة لحين الاستعمال.

القدرة التضادية للفطر *T. harzianum* ضد الفطرين الممرضين *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* في أطباق بتري

نفذت هذه التجربة باعتماد طريقة الزرع المزدوج (Dual Culture Technique)لاختبار القدرة التضادية للفطر*T. harzianum* ضد الفطرين الممرضين، إذ قسم طبق بتري حاوي على الوسط الغذائي.P.D.A إلى قسمين متساويين، و لقح مركز القسم الأول بقرص قطرة 0.5 سم من الوسط الغذائي النامي عليه الفطر التضادي بعمر 5 ايام، اما مركز القسم الثاني فقد لقح بقرص مماثل من نمو الفطرين الممرضين و كلا على حده. وكررت كل معاملة أربعة مرات مع تنفيذ معاملة مقارنة بتلقيح مركز القسم الأول من الطبق بالفطر الممرض فقط. وضعت الأطباق بشكل مقلوب في الحاضنة في درجة حرارة 25±2 °م، و بعد وصول نمو الفطر *R. solani* الى حافة الطبق تم قياس معدل أقطار النمو للفطريات الممرضة. تم حساب النسبة المئوية لتثبيط الفطريات الممرضة حسب معادلة Abbot الواردة في شعبان والملاح (1993).

$$\% \text{ للتثبيط} = \frac{\text{معدل أقطار النمو الفطري في المقارنة - معدل أقطار النمو الفطري في المعاملة}}{\text{معدل أقطار النمو الفطري في المقارنة}} \times 100$$

كفاءة الفطر *T. harzianum* في حماية بذور و نباتات الطماطة من الإصابة بالفطريات *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* و *R. solani*

تم اختبار كفاءة الفطر *T. harzianum* في حماية بذور و نباتات اربعة تراكيب وراثية من نبات الطماطة

جدول (2) المعاملات المنفذة في التجربة

المعاملات	كمية وطريقة الإضافة
R. solani	0.5% بذور دخن معقمة المحمل عليها الفطر *R. solani* أضيفت إلى التربة.
F. oxysporium* f.sp. *lycopersici	0.5% بذور دخن معقمة المحمل عليها الفطر *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* أضيفت إلى التربة.
T. harzianum	0.5% بذور دخن معقمة المحمل عليها الفطر *T. harzianum* أضيفت إلى التربة.
T. harzianum* +*F. oxysporium* f.sp. *lycopersici	0.5% بذور دخن معقمة محمل عليها الفطر*T. harzianum* مع 0.5% بذور دخن معقمة محمل عليها الفطر *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* أضيفت إلى التربة.
T. harzianum* +*R. solani	0.5% بذور دخن معقمة محمل عليها الفطر*T. harzianum* مع0.5% بذور دخن معقمة محمل عليها الفطر *R. solani* أضيفت إلى التربة.
مقارنة	1% بذور دخن معقمة أضيفت إلى التربة.

لوثت تربة مزيجية (معقمة بواسطة الفورمالين) بالفطريات و حسب المعاملات المبينة في الجدول اعلاه بعد وضعها في كيس سيلوفين لخلطها بصورة جيدة و توزيعها بمعدل 2 كغم تربة ملوثة لكل أصيص (قطر 19 سم و عمق 15 سم). سقيت جميع الاصص بالماء و بعد يومين تم زراعة الاصص ببذور كل من التراكيب الوراثية لنبات الطماطة بشكل مفرد و بواقع 15 بذرة/ أصيص. رتبت الأصيص بصورة عشوائية في مكان تنفيذ التجربة وسقيت باحتراس و بعد مرور 21 يوما من الزراعة تم حساب النسبة المئوية للإنبات. بعد مرور 35 يوما، قلعت 3-5 نباتات اختيرت بصورة عشوائية من كل مكرر ضمن المعاملة الواحدة و غسلت جيدا تحت ماء جاري لإزالة الأتربة منها و وضعت في اكياس ورقية و تجفيفها لحين ثبوت الوزن لأخذ الأوزان الجافة لها. نفذت هذه التجربة في كلية الزراعة- جامعة كربلاء خلال الموسم الزراعي 2015-2016 (الكعبي و اخرون، 2009).

تصميم التجارب و تحليلها إحصائيا

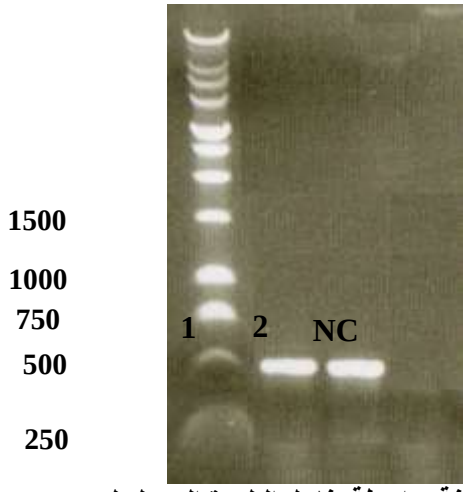
حللت جميع التجارب احصائيا وفق التصميم العشوائي الكامل (C.R.D.) و تم مقارنة المتوسطات الحسابية باستخدام اقل فرق معنوي (L.S.D.) تحت مستوى احتمال 0.01 للتجارب المختبرية و 0.05 لتجارب الاصص (الراوي و خلف الله، 1988).

النتائج و المناقشة (Results and Discussion)

تشخيص الفطريات *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* و *R. solani*

اظهرت نتائج استخلاص الحامض النووي (DNA) من الفطريات الممرضة و تعريضه الى تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) امكانية مضاعفة حزم الحامض النووي الـDNA و بالحجم المتوقع (500 قاعدة نايتروجينية) باستخدام البوادئ الامامية و الخلفية (Forward and reverse primers) المستخدمة في هذه الدراسة.

(Ginan، Wardeh، Gazalah و Selmoren) من الاصابة بالفطرين الممرضين بتطبيق المعاملات الآتية (جدول 2).



شكل 1: حزم الحامض النووي (DNA) المضاعفة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من الفطريات الممرضة *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* (1) و *R. solani* (2). M= 1Kp DNA ladder marker .NC: معاملة مقارنة (Negative control).

كما بينت نتائج تحليل تسلسل القواعد النايتروجينية (Nucleotide sequence) لحزم الحامض النووي المضاعفة (شكل 2 و 3) و بأستخدام برنامج BLAST، لمقارنتها مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) و العائدة لنفس العزلات الفطرية المستعملة في هذه الدراسة، بأن احد العزلات الفطرية المعزولة في هذه الدراسة هي عائدة للفطر *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* وذات تشابه وراثي ابلغ 100% مع عزلات نفس الفطر *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* المعزولة من كاليفورنيا (Accession NO. AY263991) و هولندا (Accession NO. EF437289). كما اثبتت النتائج ظهور سلالة جديدة من الفطر *R. solani* و التي تم تسجيلها في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) تحت رقم الادخال (Accession No.) KY283953.

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10         20         30         40         50
cgatctgctg agggtaagcc gtccttcgcc tcgatttccc caatgggttc
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        60         70         80         90        100
tccggatttc tggagacttg taggggttgt gggatttttg atgtgtcgtc
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       110        120        130        140        150
tccggacggg cggtgcaggg tagtcgagtt agacttggtg gaattccgtc
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       160        170        180        190        200
gataggagtt ccgtcgagtc tggtcagctg tgtgttggac ggtgtagggt
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       210        220        230        240        250
aggctgcttg gacatggtcg gttcgaggat cgattcgagg gccggcctgt
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       260        270        280        290        300
cgatgatgtg tgatgtatgc ggtctagggt aggttggttt gtcttggttc
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       310        320        330        340        350
gatttgatgt cggctcccgt gcaggccaga gtgaggggg tccagggtag
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       360        370        380        390        400
gtgcagggta ggcagcttag atttggtcga tctggaggtc gattctccgg
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       410        420        430        440        450
ctggcggatc tgacactgtc gaaacgagat gcgaggggtg tagggtaggc
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       460        470        480        490        500
```

شكل 2: التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي (PCR-amplified product) المضاعفة من الفطر *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         10         20         30         40         50
TCGCAGGTCC TTCTATTTAA CTGTTGTTGG GCATGTGCAC CCCTTTTTTT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         60         70         80         90        100
TTCATCCACA CACACCTGTG CACTTGTGAG CCAGCTTGGA GGACTTTATT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        110        120        130        140        150
GGACTCCTTT TGTCTACTTA ATCCACACAA ACTCAATTTA TTTTAAACTG
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        160        170        180        190        200
AATGTATTTT GATGTAACGC ATCTAATACT AAGTTTCAGC AACGGATCTC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        210        220        230        240        250
TTGGCTCTCG CATCGATGAA GAACGCAGAC TCGAAATGCG ATAAGGAATG
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        260        270        280        290        300
TGAATTGCAG AATTCAGTGA ATCATCGAGG ATCTTTGAAC GCACCTTGCG
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        310        320        330        340        350
CTCCTTGGTA TTCCTTGGAG CATGTAATCT GTATTGAGTA TCATGAAATC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        360        370        380        390        400
TTCAAAGTTA AAATCTTTTG TTAACTCAAT TGGTTTCTAT TTTTGGTATT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        410        420        430        440        450
GGAGGTCTTT GCATTGCTTC ACACCTGCTC CTCTTTGTTC ATTAGCTGGA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....
        460        470        480        490
TCTCCGTGTT ATTGCTTGGT TCCACTAGGC GTGATAAAGT TATCTATCG
```

شكل 3: التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي (PCR-amplified product) المضاعفة من الفطر *R. solani* بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

وجد من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر *R. solani* المضاعفة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) ان اعلى نسبه تشابة وراثي كانت مع عزلة الفطر *R. solani* العراقية (GenBank Accession number: KF372660)، في حين كانت اكثرها تباعدا عن عزلات الفطر *R. solani* الاسترالية (GenBank accession numbers: AF153804 and AF153807) و الهندية (GenBank accession number: JF701744) جدول (3). يتضح من خلال النتائج ان الفطر *R. solani* المعزولة في هذه الدراسة هي سلالة جديدة غير معروفة سابقا في العالم و تم تسجيلها في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

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

Fungus	Isolate or strain name	Origin	The most similar sequences in GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity (%)
Rhizoctonia solani	IQ34	Iraq	KF372660	98
Rhizoctonia solani	IQ40	Iraq	KF372662.1	95
Rhizoctonia solani	IQ49	Iraq	KF372653.1	94
Rhizoctonia solani	IQ35	Iraq	KF372646.1	94
Rhizoctonia solani	IQ23	Iraq	KF372645.1	94
Rhizoctonia solani	MML4001	India	JX535004	94
Rhizoctonia solani	S9	Cuba	KC709576.1	94
Rhizoctonia solani	T-9	Turkey	FR734296.1	94
Rhizoctonia solani	RsolTeaIN1	India	KJ466117	94
Rhizoctonia solani	IQ30	Iraq	KF372657	94
Rhizoctonia solani	B1B6	Greece	FJ480896	94
Rhizoctonia solani	RUPP93	India	JF701784	92
Rhizoctonia solani	RKLC1	India	JF701742	92
Rhizoctonia solani	RKNG9	India	JF701745	91
Rhizoctonia solani	KNM3	India	KC997793	91
Rhizoctonia solani	RDLM6	India	JF701717	90
Rhizoctonia solani	Wd	Australia	AF153806	90
Rhizoctonia solani	CH1	Australia	AF153803	90
Rhizoctonia solani	5 FG-2013	China	KC782852	90
Rhizoctonia solani	3625	Costa Rica	JX294322	90
Rhizoctonia solani	3977	Costa Rica	JX294345	90
Rhizoctonia solani	3629	Costa Rica	JX294325	90
Rhizoctonia solani	A55 FG-2013	China	KC782854	90
Rhizoctonia solani	D064	Venezuela	KU377459	90
Rhizoctonia solani	D054	Venezuela	KU377458	90
Rhizoctonia solani	RKNM8	India	JF701744	89

Rhizoctonia solani	**H1**	**Australia**	**AF153804**	**89**
Rhizoctonia solani	**WDa**	**Australia**	**AF153807**	**89**

القدرة التضادية للفطر *T. harzianum* ضد الفطرين *R. solani* و *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici*

اظهرت النتائج المبينة في جدول (4) ان للفطر *T. harzianum* كفاءة تضادية عالية في تثبيط نمو الفطرين الممرضين، اذ بلغت النسبة المئوية لتثبيط الفطريات *R. solani* و *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* 35% و 42.04%، على التوالي و التي اختلفت بفارق معنوي عن معاملة المقارنة الحاوية على الفطريات الممرضة فقط. اتفقت هذه النتائج مع ما اشار اليه الكثير من الباحثين بقدرة الفطر *T. harzianum* في تثبيط نمو العديد من المسببات المرضية مثل الفطرين *F . oxysporium* f.sp. و *R. solani* (Attitalla، 2004 و Mokhtar و Dehimat،2014). يمكن تفسير كفاءتة التضادية العالية للفطر *T. harzianum* تجاه العديد من المسببات المرضية إلى امتلاكه العديد من الآليات و منها ظاهرة التطفل الفطري، إذ يلتف غزله الفطري حول غزل الفطر الممرض مكوناً لوالب أو تراكيب ضاغطة (Appressoria) التي تخترق خلايا الغزل الفطري لغرض التطفل عليه (Mukhtar و اخرون، 2013)، أضافة الى زيادة إفراز بعض الأنزيمات مثل B-Glucanase، Cellulase، Chitinase التي لها قدرة على تحطيم الكلوكان (Glucans) في جدر خلايا الفطر الممرض (Rubeena و اخرون، 2014 و Rahnama و اخرون،2015 و Gautam و اخرون، 2015)، أو قد يعود لقدرت الفطر التضادي على إفراز بعض المركبات السامة، إذ لاحظوا Ramos و اخرون (2009) و Horace و اخرون (2015) أن الفطر *T. harzianum* يفرز مركبات سامة تعرف بالـ Pyrones، اذ ذكروا بأن العزلات القوية التضاد تفرز كميات كبيرة من هذا المركب أما الضعيفة منها فلم يلاحظ إنتاجها لهكذا هذا المركب (Bonnarme و اخرون،1997 و Serrano-Carreón و اخرون، 2004).

جدول (4) كفاءة الفطر *T. harzianum* في نمو الفطرين الممرضين *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* و *R. solani* في الوسط الغذائي P.D.A.

المعاملة	الفطريات الممرضة (سم)			
	R. solani	% للتثبيط	*F. oxysporium* f.sp. *lycopersici*	% للتثبيط
T. harzianum	**4.35**	**51.66**	**3.28**	**48.42**
Control	**9.00**	**0.00**	**6.36**	**0.00**
L.S.D.(0.01)	**3.52**	-	**2.73**	-

كفاءة الفطر *T. harzianum* في حماية بذور و بادرات بعض التراكيب الوراثية لنبات الطماطة من الاصابة بالفطريات الممرضة *R. solani* و *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici*.

يلاحظ من خلال النتائج المبينة في جدول (5) ان اعلى نسبة لانبات البذور كانت في هجين الطماطة Ginan المعاملة بالفطر الاحيائي *T. harzianum* فقط (86.83%) و التي اختلفت بفارق معنوي عن نسبة الانبات لبذور نفس الهجين غير المعامل باالفطر *T. harzianum* و التي بلغت فيها نسبة انبات البذور 80.16%. كما لوحظ ان اقل نسب لانبات البذور كانت في هجين الطماطة Ghazalah المعاملة بالفطريات الممرضة *R. solani* و *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* و البالغة 33.72% و 31.48% و التي اختلفت بفارق معنوي عن معاملة المقارنة التي بلغت فيها نسبة انبات البذور74.45%. اعطت نتائج التداخل بين الفطر *T. harzianum* و الفطريات الممرضة *R. solani* و *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* اعلى نسبة لانبات بذور هجين الطماطة Ginan من بين التراكيب الوراثية الاخرى، اذ بلغت نسبة الانبات 73.49% و 76.82%، على التوالي.

اما بالنسبة الى اطوال النباتات، فقد وجد ان للفطريات الممرضة *R. solani* و *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici* دور وا ضحا في اختزال معدل طوال النبات و كان الهجين Selmoren اكثر التراكيب الوراثية تأثرا، اذ بلغ معدل اطوال النباتات 5.14 و 4.62 سم عند المعاملة بالفطريات الممرضة، على التوالي، و التي اختلفت معنويا عن معاملة المقارنة غير الحاوية على اي من الفطرين الممرضين(11.13سم). كما اوضحت النتائج ان اعلى معدل لاطوال النباتات تحقق عند نباتات هجين الطماطة Ginan المعامل بالفطر *T. harzianum* و التي اختلفت معنويا عن معدل اطوال النباتات في معاملة المقارنة و التي بلغت 20.64سم. كما اظهرت المعاملة بالفطر *T. harzianum* افضل المعاملات في توفير الحماية لنباتات هجين الطماطة Ginan من الاصابة بالفطريات *R. solani* و *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici*، اذ معدل طول النبات 18.54 و 18.17 سم و التي لم تختلف بفارق معنوي عن

معاملة المقارنة (غير الحاوية على الفطر الممرض (20.64 سم).

اما بالنسبة الى الاوزان الجافة للنباتات المعاملة، فقد لوحظ ان اعلى وزن جاف كان عند هجين الطماطة Ginan المعامل بالفطر *T. harzianum* التي بلغت 0.626 غم /نبات و التي لم تظهر فرقا معنويا عن معدل الوزن الجاف للنباتات غير المعاملة بأي من الفطريات المستعملة في الدراسة. كما اظهر التداخل بين الفطر *T. harzianum* و الفطر الممرض *R. solani* زيادة في الاوزان الجاف لنبات الطماطة Ginan و التي اختلفت بفارق معنوي عن معاملة المقارنة الحاوية على الفطر الممرض لوحدة. قد يعود زيادة كفاءة الفطر *T. harziznum* في توفير الحماية لبذور ونباتات الطماطة من الاصابة بالفطريات الممرضة انتاجة للعديد من المواد التي تعمل على كبح فعل الممرضات في التربة او دورها في استحثاث المقاومة الجهازية في النبات من خلال انتاجة مواد كيميائية تعمل على تثبيط او قتل المسببات المرضية (Shelar و Chavan، 2015).

جدول (5) تأثير بعض عوامل المكافحة في حماية بذور و بادرات بعض التراكيب الوراثية لنبات الطماطة من الاصابة بالفطريات الممرضة *R. solani* و *F. oxysporium* f.sp. *lycopersici*

التركيب الوراثي	المعاملة	الانبات (%)	تعفن البذور (%)	طول النبات (سم)	الوزن الجاف (غم/ نبات)
Selmoren	Control	63.52	36.48	11.13	0.384
	F. oxysporium f.sp. *lycopersicum*	38.32	61.68	4.62	0.023
	R. solani	30.09	69.91	5.17	0.027
	T. harzianum	70.19	29.81	10.59	0.22
	T. harzianum+ *F. oxysporium* f.sp. *lycopersicum*	60.18	39.82	8.12	0.101
	T. harzianum+ *R. solani*	56.85	43.15	6.49	0.097
Ginan	Control	80.16	19.84	20.78	0.79
	F. oxysporium f.sp. *lycopersicum*	54.96	45.04	14.67	0.405
	R. solani	46.73	53.27	15.22	0.396
	T. harzianum	86.83	13.17	20.64	0.626
	T. harzianum+ *F. oxysporium* f.sp. *lycopersicum*	76.82	23.18	18.17	0.507
	T. harzianum+ *R. solani*	73.49	26.51	16.54	0.503
Wardeh	Control	75.52	24.48	14.35	0.421
	F. oxysporium f.sp. *lycopersicum*	49.78	50.22	7.84	0.048
	R. solani	42.09	57.91	8.39	0.056
	T. harzianum	82.19	17.81	13.81	0.351
	T. harzianum +*F. oxysporium* f.sp. *lycopersicum*	68.85	31.15	11.66	0.141
	T. harzianum +*R. solani*	65.19	34.81	11.34	0.111
Ghazalah	Control	74.45	25.55	13.19	0.128
	F. oxysporium f.sp. *lycopersicum*	31.48	68.52	6.68	0.079
	R. solani	33.72	66.28	7.23	0.092
	T. harzianum	75.13	24.87	12.65	0.178
	T. harzianum+ *F. oxysporium* f.sp. *lycopersicum*	57.78	42.22	10.18	0.124
	T. harzianum+ *R. solani*	51.08	48.92	8.55	0.123
	L.S.D. (0.05)	4.638	-	0.631	0.092

المصادر (References cited)

شعبان ، عواد ونزار مصطفى الملاح .(1993). المبيدات، دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. 397 صفحة.

الراوي، خاشع محمود و خلف الله، عبد العزيز محمد .(1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية، دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. 488 صفحة.

الكعبي، عقيل نزال و الشجيري، كريم عبد الحسين و عبدالواحد، صالح عبدالواحد .(2009). تأثير بعض المبيدات الكيميائية الفطرية و فطريات المقاومة الإحيائية في مقاومة مرض تعفن بذور و موت بادرات الطماطة المتسبب عن الفطرين الممرضين *Rhizoctonia solani* Kühn و*Fusarium solani* Marti. مجلة القادسية للعلوم الصرفة، المجلد 14 (3)، صفحة 1-11.

Akrami M., Yousefi Z. .(2015). Biological control of *Fusarium* wilt of tomato (*Solanum lycopersici*) by *Trichoderma* spp. as antagonist fungi. *Biological Forum -An International Journal,* 7(1): 887-892.

Alaei H., Amir H. and Ali D. (2012) Molecular characterization of the rDNA-ITS sequence and a PCR diagnostic technique for *Pileolaria terebinthi*, the cause of pistachio rust. *Phytopathologia Mediterranea* 51, 3, 488-495.

Arif M., Shilpi C., Zaidi N. W., Rayar J. K., Variar M. and Singh U. S. .(2012). Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1α) gene. *African Journal of Biotechnology,* 11(2), 444-447.

Attitalla I. H. .(2004). Biological and molecular characteristics of microorganism-stimulated defense response in *Lycopersicom esculentum*. PhD thesis. University. Uppsala, Sweden. 82 pp.

Bonnarme P., Djian A., Latrasse A., Féron G., Giniès C., Durand A. and Le Queré J. L. .(1997). Production of 6-pentyl-β-pyrone by *Trichoderma* spp. from vegetable oils. *Journal of Biotechnology,* 56 (2): 143-150

Cai H., Caswell J. and Prescott J. .(2014). Non culture molecular techniques for diagnosis of bacterial disease in animals a diagnostic laboratory perspective. *Journal of Veterinary Pathology,* 51: 341–350.

Dewan M. M. .(1989). Identity and frequency of occurrence of fungi in roots of Wheat and rye grass and their affection take-all and host growth. Ph.D. Thesis. University of Wes. Australia. 210 pp.

Fang Y. and Ramasamy R. P. .(2015). Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors,* 4: 537- 561.

Gautam S. S., Kanchan K., Satsangi G. P. .(2015). Effect of *Trichoderma* species on germination and growth of Mungbean (*Vigna radiata* L.) and its antagonistic effect against fungal pathogens. *International Journal of Advanced Research,* 3(2): 153-158.

Hiluf K. G and Ayalew A. A. .(2015). Assessment of pesticide use, practice and environmental effects on the small holder farmers in the north shoa zone of amhara national regional state of ethiopia. *Research journal of agricultural and environmental sciences,* 2(2): 16-24.

Horace J. A., Estrada M., Galindo E. and Serrano-Carreón L. (2015) From shake flasks to stirred fermentors: Scale-up of an extractive fermentation process for 6-pentyl-pyrone production by *Trichoderma harzianum* using volumetric power input. *Process Biochem,* 41 (6):1347-1352.

Mokhtar H. and Dehimat A. .(2014). Department of Nature and *In vitro* and *in vivo* efficiency *of Trichoderma harzianum* against *Rhizopus* soft rot occurred on tomato fruits (*Lycopersicon esculentum*). *Agriculture and Biology Journal of North America,* 5(6): 240-244.

Mukhtar T., Hussain M. A. 2 and Muhammad Z. K. .**(2013).** Biocontrol potential of *Pasteuria penetrans, Pochonia*

Biotechnology Letters, 26(18): 1403-1406.

Shelar G. B., Chavan A. M. .(2015). Myco-synthesis of silver nanoparticles from *Trichoderma harzianum* and its impact on germination status of oil seed. *Biolife*, 3: 109-113.

Singh R. S. .(2005). Plant Diseases. New Delhi, India: Oxford and IBH.

Taylor R. J., Salas B., Secor G. A., Rivera V., Gudmestad N. C. .(2002). Sensitivity of North American Isolate *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* to mefonoxam (metalaxyl). *Plant Disease*, 86: 797- 802.

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

chlamydosporia, *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* against *Meloidogyne incognita* in okra. *Phytopathologia Mediterranea* 52(1): 66-76.

Rahnama N., Foo H. L., Rahman N. A. A. and Ariff A..(2015). Saccharification of rice straw by cellulase from a local *Trichoderma harzianum* SNRS3 for biobutanol production. *BMC Biotechnology* 23: 1-12.

Ramos A. S., Fiaux S. B. and Leite S. G. .(2009). Production of 6-pentyl-β-pyrone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:712-717.

Romberg M. K. and Davis R. M. .(2007). Host range and phylogeny of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* from potato and tomato in California. Plant Dis. 91: 585-592.

Rubeena M., Kannan N., S. Sajith, S. Sreedevi, Prakasan P., Unni K. N., Josh M. K., Jisha V. N., Pradeep S. and Benjamin S. .(2013). Lignocellulolytic activities of a novel strain of *Trichoderma harzianum*, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, (4): 214-221.

Serrano-Carreón L., Flores C., Rodríguez B. and Galindo E .(2004). *Rhizoctonia solani*, an elicitor of 6-pentyl-β-pyrone production by *Trichoderma harzianum* in a two liquid phases, extractive fermentation system.