التشخيص الجزيئي لبعض الفطريات المسببة لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء ومقاومتها باستعمال البكتريا *Rhizobium leguminosarum* biovar. viciae والفطر الاحيائي *Trichoderma viride* في محافظة بابل

عهد عبد علي هادي مطلوب **محمد احمد عمران**

جامعة الفرات الاوسط التقنية/ الكلية التقنية المسيب

الملخص

بينت نتائج المسح الحقلي الذي اجري في 15 حقلاً مزروعة بنبات الباقلاء تابعة لمحافظة بابل انتشار مرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء في جميع المناطق التي شملها المسح وبنسب اصابة تراوحت بين 40-100% وبشدة اصابة تراوحت بين 26.7-75% وبينت نتائج العزل والتشخيص تباين في وجود الفطريات اذ وجد ان الفطر *Rhizoctonia solani* و *Fusarium solani* و *Macrophomina phaseolina* اكثرها ظهورا . اثبتت نتائج التشخيص الجزيئي لهذه الفطريات ان 12 عزلة من الفطر *R. solani* و 9 عزلات من الفطر *M. phaseolina* متطابقة ما عدا الفطر *F. solani* لم يظهر تطابق مع عزلتين تابعة له باستخدام تقنيةPCR Polymerase Chain Reaction وهذا دليل على دقة عمل هذه التقنية في التشخيص. بينت نتائج الاختبار للمقدرة الامراضية للفطريات المدروسة تفاوت في نسب الانبات وتغاير في شدة الاصابة. تم الحصول على 7 عزلات من البكتريا *Rhizobium leguminosarum* biovar.*viciae* وأظهرت النتائج قدرة هذه العزلات على تثبيط الفطريات الممرضة وبنسبة تراوحت بين50.74-100%. واظهرت نتائج الظلة الخشبية تفوق معاملة التكامل بين البكتريا *R. leguminosarum* والفطر الاحيائي *T. viride* المضاف الى التربة الملوثة بالفطر الممرض محدثة بذلك خفضا معنويا في نسبة وشدة الاصابة بمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء اذ تراوحت بين 53.33-66.67% و15.00-18.33% على التوالي كما لوحظ تفوقه في زيادة معايير النمو في النبات قياسا مع معاملة المقارنة الفطر بمفرده .

Molecular identification of some Fungi caused Broad bean root and crown disease controlled by using *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae bacteria and Bioagents *Trichoderma viride* in the province of Babylon

Ahed A H Matloob **Mohamed A I K Alkaif**

Al furat Al Alawsat tech. Uni. Al Musaib Tech. College

ABSTRACT:

The field survey results that conducted in 15 fields planted with Broad bean belong to Babylon province showed the spread of roots and bases of peas stems rot disease in all the regions that covered with this survey with infection percentage of about 40 – 100% with a severity of injury about 26.7 – 75%. The results of isolation and diagnosis Variation in the presence of fungi found that the fungus *Rhizoctonia solani* , *Fusarium solani* and *Macrophomina phaseolina* The most visible. The results of molecular diagnostics of these fungi proved that there are 12 isolates *R. solani* and 9 isolates of the fungus *M. phaseolina* complete except the fungus *F. solani* do not appear complete with its two isolates used by technical of PCR Polymerase Chain Reaction. The test results of the ability of pathogenic fungi studied showed Variation in the rates of germination and variation in the severity of infection. Been getting 7 isolates of bacteria Rhizobium leguminosarum biovar viciae of been has been getting and the results showed the ability of these isolates were discouraged by pathogenic fungi and ranged from 50.74-100%. The results of wooden canopy showed that the treatment outweigh the integration between bacteria and mushrooms R. leguminosarum bio T. viride added to the contaminated soil fungus pathogen causing significance reduction in the proportion of the severity of rot disease and the base of peas stems ranging between 53.33- 66.67% and 15.00-18.33% respectively as observed superiority in increasing the growth standards in the plant compared with comparison treatment of mushroom alone.

1-المقدمة:

تعود الباقلاء.*Vicia faba* L إلى العائلة البقولية Fabaceae وتعد من النباتات الاقتصادية المهمة في العديد من بلدان العالم وتأتي بالمرتبة الثانية بعد العائلة النجيلية من حيث الأهمية الاقتصادية والجزائر الموطن الأصلي لها (Grahamو Vance، 2003 وFAO، 2006) يزرع نبات الباقلاء في اغلب المناطق الزراعية في العراق إذ بلغت المساحة المزروعة فيها لعام 2012 حوالي 58600 دونماً وكمية الانتاج 114600 طن (الجهاز المركزي للإحصاء،2012). تصاب الباقلاء بالعديد من الأمراض الفطرية وأهمها مرض تعفن الجذور وقواعد السيقان والذي يعد من الأمراض ذات التأثير الكبير على محصول الباقلاء في العديد من مناطق العالم (2003,Icarda) ففي السنوات الاخيرة لوحظ انخفاض في معدلات الانتاج في محصول الباقلاء في العراق اذ بلغ الانتاج في سنة 2000 حسب ما اشارة اليه المركز الاحصائي السنوي 221524 طن اما في سنة 2011 بلغ الانتاج 154400 طن اما في عام 2012 فبلغ الانتاج 114600 طن وان هذا الانخفاض في الانتاج اسبابه كثيرة ومن ابرز هذه الاسباب هو الاصابة بالعديد من المسببات المرضية للنبات التي تتواجد في التربة وأهمها الفطر *Fusarium* spp. ، *Rhizoctonia solani* و *Macrophomina phaseolina* و .*Pythium* spp, إذ تقوم هذه الفطريات بمهاجمة البذور والبادرات وجذور هذا المحصول مسببة تعفنه مما يؤدي إلى حدوث خسائر كبيرة في الإنتاج (Van Leurوآخرون ،2008).استخدمت طرائق عدة لمكافحة مرض تعفن جذور وقواعد سيقان نبات الباقلاء منها استخدام المكافحة الكيميائية (جاسم ،2007). لكن وجد أن للمبيدات الكيميائية بعض التأثيرات السلبية في البيئة وصحة الإنسان وأحياء غير المستهدفة نتيجة للاستعمال العشوائي والخاطئ لهذه المبيدات (Kasumbwe واخرون ،2014). لذلك بداء التفكير في البدائل التي من أبرزها استعمال الكائنات الحية الدقيقة في برامج المكافحة الإحيائية لخفض لقاح المسببات المرضية وزيادة الإنتاج وتأتي في مقدمة هذه العوامل البكتريا المحفزة لنمو النبات Plant Growth PGPR Promoting Rhizobacteria ومنها البكتريا *Rhizobium* (Bin وآخرون 2002). تعزى التأثيرات الايجابية لهذه الكائنات اتجاه النبات لما تمتلكه من خصائص مميزة آذ أنها حظيت باهتمام كبير من قبل المهتمين بخصوبة التربة فاستعملت كمخصبات حيوية عند زراعة المحاصيل البقولية (Mathews وSparkes ، 2001) ومقدرتها على التعايش مع النبات العائل وقابليتها على البقاء والتكاثر في منطقة الجذور وبعد أنبات البذور. (Boddey وHungria، 1997) وكذلك تتميز بالفعل التثبيطي أو التنافسي لمسببات الامراض وتحفيز نمو ودفاعات العائل النباتي (Mazen وآخرون 2008). كما يعد الفطر *Trichoderma viride* من عوامل المقاومة الإحيائية لمسببات إمراض النبات، لما يمتلكه من خصائص تضادية متنوعة اتجاه المسببات المرضية وأهميته في تحسين نمو النبات وإنتاجه،(Krupa وآخرون، 2014 و Talla وآخرون ، 2015)

ولأهمية مرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء وللبحث عن طرائق مقاومة تنسجم مع التوجهات الحديثة في العالم في التقليل من استعمال الكيمياويات في الزراعة صممت هذه الدراسة بهدف: عزل وتشخيص بعض الفطريات من نباتات الباقلاء المصابة واختبار مقدرتها الامراضية ومحاولة مكافحة مسببات مرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء باستعمال بعض العوامل الإحيائية وإجراء التكامل بينها.

2-المواد وطرائق العمل:

2-1مسح مرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء في بعض مناطق محافظة بابل

تم أجراء مسح لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء للموسم الزراعي 2013- 2014 اذ انتخب 15 حقل، تراوحت مساحتها 1-7.5 دونم في محافظة بابل تم حساب النسبة المئوية للإصابة و حساب شدة الاصابة وفق الدليل المرضي وكما يأتي:0 = جذور سليمة.1 = تلون(تعفن) الجذور الثانوية .2 = تلون الجذور الثانوية وجزء من الجذر الرئيسي.3 = تلون الجذر الرئيسي دون تلون قاعدة الساق.4 = تلون الجذر الرئيسي وتهرؤه وتلون قاعدة الساق.5 = موت النبات. وحسبت شدة الاصابة بأعتماد معادلة Mckinney (1923) كما يلي:

$$\% \text{ لشدة الإصابة} = \frac{(\text{عدد النباتات في الدرجة } 0 \times 0) + (\text{عدد النباتات في الدرجة } 1 \times 1) + \ldots + (\text{عدد النباتات في الدرجة } 5 \times 5)}{\text{مجموع النباتات المفحوصة} \times 5} \times 100$$

2-2عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لجذور وقواعد سيقان الباقلاء:-

جلبت النباتات التي ظهرت عليها أعراض الإصابة إلى المختبر، اخذ أجزاء من الجذور وقواعد السيقان التي ظهرت عليها أعراض التعفن والتقرحات ، غسلت بالماء الجاري وعقمت سطحياً بمحلول هايبوكلورات الصوديوم (0.5% كلور حر) وحسب الطرق الموصى بها ونشفت بورق الترشيح المعقم ونقلت بواسطة ملقط معقم وزرعت بواقع 4 قطع نباتية في كل طبق بتري قطر 9 سم حاوي الوسط الزرعي (PDA) Potato Dextrose Agar المضاف إلية المضاد الحيوي Tetracycline بتركيز 200 ملغم / لتر وذلك بعد تعقيم الوسط بجهاز المؤصدة (121 م° وضغط 1.5كغم/سم^2) لمدة 15 دقيقة حضنت الأطباق في درجة حرارة 25±1 م° لمدة 3 أيام،

صورة 1. أعراض الإصابة بمرض تعفن جـــذور وقـــــواعد سيقان الباقلاء

أ- الأعراض على الجذور وقاعدة الساق ب- اعراض على الجذر الرئيسي والثانوية

2-3التشخيص الجزيئي:

تم تنفيذ هذه الدراسة في مختبر الأبحاث الجزيئية/ شعبة الأغذية المحورة جينيا/ قسم البايلوجي الجزيئي/ مركز تلوث الغذاء/ دائرة بحوث البيئة والمياه التابع لوزارة العلوم والتكنولوجيا/ بغداد.

- **طرائق العمل الخاصة بتقنية الـ PCR**

أولاً: إستخلاص الحامض النووي DNA وتنقيته

تم استخدام 12عزلة من الفطر *Rhizoctonia solani* و 12عزلة من *Fusarium solani* و9 عزلات من *Macrophomina phaseolina* والتي سبق عزلها من جذور وقواعد سيقان الباقلاء المصابة من محافظة بابل اذ استخدم Kit الخاص بالاستخلاص من شركة Geneaid (Reagent Genomic DNA Kit) نميت هذة العزلات على الوسط الزرعي Potato Dextrose Broth لمدة 7 ايام وحضنت على درجة حرارة25±1 م° رشح الغزل الفطري بواسطة ورق الترشيح بعد التخلص من الوسط المغذي، وضع الغزل الفطري المرشح داخل الهود لغرض تجفيف العينة والتخلص من الرطوبة الزائدة للحصول على كثافة كبيرة من الغزل الفطري وضعت كمية منه في هاون خزفي ثم طحن بوجود النتروجين السائل ، نقلت كمية منه الى أنبوب ابندروف (Eppendroffe tube) حاوية على 293 مايكروليتر من محلول EDTA الموضوع في درجة حرارة 65 م° ثم سُحق بواسطة عيدان خشبية .أضيف 7.5 مايكروليتر من 20ملغم/مل انزيم Lyticase مع التحريك بلطف أربع مرات لغرض المزج.حُضنت العينات بدرجة حرارة 37 °م لمدة -60 30دقيقة لكي يقوم الأنزيم بتحطيم الجدار الخلوي، ثم بُردت الى درجة حرارة الغرفة.نُبذت مركزياً بسرعة 13000-16000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين وأزيل الرائق (Supernatant) .اضيف 300 مايكروليتر من محلول التحلل Cell Lysis Buffer الى كل أنبوبة ابندروف الحاوية على الراسب الفطري وحركت بلطف لغرض المزج.حضنت لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 60°م مع التقليب المستمر كل 3 دقائق.اضيف 5 مايكروليتر من انزيم تحطيم ال RNase ثم حضنت لمدة 5 دقائق.اضيف 100 مايكروليتر من محلول ترسيب البروتينات Protein Removal Buffer، مُزجت الأنابيب جيداً بواسطة المازج الكهربائي Vortex mix لمدة 10 ثانية.تُركت العينات على الثلج لمدة خمس دقائق.نبذت مركزياً بسرعة -16000 14000 دورة/دقيقة لمدة ثلاث دقائق.نُقل الرائق الحاوي على الـDNA المستخلص بواسطة ماصة دقيقة الى أنابيب ابندروف نظيفة ومعقمة حاوية على 300 مايكـــروليتـر من الأيزوبروبانول بدرجة حرارة الغرفة.حُركت الأنابيب بلطف عدة مرات لحين ظهور الـDNA بشكل تركيب يشبه الخيط.نُبذت مركزياً بسرعة 14000-16000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين.أزيل الرائق برفق وقُلبت الأنابيب على ورقة نشاف معقمة. اضيف 300 مايكروليتر بدرجة حرارة الغرفة من 70% إيثانول وقُلبت الأنابيب بلطف عدة مرات لغسل الـDNA المترسب.نُبذت مركزياً بسرعة 14000-16000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين، ثم أزيل الإيثانول برفق.قُلبت الأنابيب على ورقة نشاف معقمة لمدة 10-15 دقيقة لغرض تجفيف الراسب.أضيف 50-100 مايكروليتر من محلول-Tris Borate EDTA buffer (TEB) وحضن على درجة حرارة 60 °م لمدة 30-60 دقيقة.إذا لم يُنجز التضخيم في نفس يوم الاستخلاص تُحفظ النماذج جاهزة بدرجة حرارة 2-8°م

البادئ الخاص المستخدم في عملية تشخيص الفطريات

ثانياً: الكشف عن الحامض النووي منقوص الأوكسجين (DNA)

استخدمت طريقة الترحيل الكهربائي Electrophoresis بإستعمال هلام الأكاروز بتركيز 1% للكشف عن الحامض النووي منقوص الأوكسجين وكانت المحاليل المتطلبة هي: Agarose وTBE buffer وBromophenol blue و Ethidium bromide. تم ترحيل الحامض النووي منقوص الأوكسجين لاجل الكشف عن نقاوته حسب طريقة (Sambrook واخرون، 1989) .

ثالثاً: طريقة عمل تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

استخدمت تقنية الـPCR لتضخيم مناطق التفاعل باستخدام البادئ المذكور في الجدول (1). أجريت طريقة العمل بحجم 20 مايكروليتر وكما موضح في الجدول (2) اعتماداً على النشرة المرفقة في Master Mix المصنع من شركة Bioneer

جدول 1. بعض الصفات الخاصة بالبادئات التي تم استخدامها للكشف عن الفطريات

اسم الفطر	اسم البادئ	تسلسل النيوكليوتيدات من′5 الى ′3	حجم الحزمة التي تنتجه (bp)
R. solani	ITS1f	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'	700
	ITS4r	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	
F. solani	TEF-F.s4f	5-ATCGGCCACGTCGACTCT-3	658
	TEF-F.s4r	5-GGCGTCTGTTGATTGTTAGC-3	
M. phaseolina	MpKF	5-CCGCCAGAGGACTATCAAAC-3	350
	MpKR	5-CGTCCGAAGCGAGGTGTATT-3	

جدول 2. أحجام المواد الكيمياوية المستخدمة في التفاعل

المواد الكيميائية	الحجم
Master Mix	5 µl
Primer forward	2.5 µl
Primer Reverse	2.5 µl
DNA	5 µl
Nuclease – Free Water	أكمل الحجم إلى 20
Total	20 µl

بعد إتمام الإضافات جميعها مُزجت العينات مركزياً بوساطة جهاز الطرد المركزي الخاص بأنابيب PCR ونقلت العينات إلى جهاز الPCR الذي من نوع Cycler Eppendorf Master (Hambrug,Germany) اجري تفاعل تضخيم السلاسل لدنا العزلات *Rhizoctonia solani* اعتمادا على البرنامج الموصوف من قبل Stojsinواخرون(2007) وكما يلي:

رقم الخطوة	الخطوات	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
1	Initial Denaturaion	95مْ	2 min	1
2	Denaturation	94 مْ	30 Sec.	35
3	Annealing	55 مْ	1 min	
4	Extension	72 مْ	1 min	
5	Final extension	72 مْ	10 min	1

واجري تفاعل تضخيم السلاسل لدنا العزلات *F. solani* اعتمادا على البرنامج الموصوف من قبل (Arif واخرون،2012) .

رقم الخطوة	الخطوات	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
1	Initial Denaturaion	94مْ	2 min	1
2	Denaturation	94 مْ	1 min	40
3	Annealing	58 مْ	1 min	
4	Extension	72 مْ	2 min	
5	Final extension	72 مْ	10 min	1

واجري تفاعل تضخيم السلاسل لدنا العزلات *Macrophomina phaseolina* اعتمادا على البرنامج الموصوف من قبل (Babu واخرون ,2007).

رقم الخطوة	الخطوات	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
1	Initial Denaturaion	95مْ	2 min	1
2	Denaturation	95 مْ	30 Sec.	25
3	Annealing	56 مْ	1 min	
4	Extension	72 مْ	2 min	
5	Final extension	72 مْ	10 min	1

رابعاً: طريقة عمل الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية الـPCR

أستخدمت طريقة الترحيل نفسها المذكورة اعلاه في الفقرة ثانياً للكشف عن عملية تضخيم الـDNA ماعدا استخدام هلام الأكاروز بتركيز 1.5% بدلاً من 1%.

2-5اختبار المقدرة الأمراضية لبعض الفـطريات المعزولة

تم اختبار المقدرة الامراضية لعزلات الفطريات الأكثر تكرارا من بين الفطريات الاخرى ،التي شملت (12عزلة من الفطر*F. solani* و12 عزلة مـن الفـطر *R. solani* و9 عزلات *M. phaseolina*) وتأثيرها في انبات بذور الفجل على الوسط الزرعي الاكـر والماء Water Agar (20 غم اكر ، 1 لتر ماء مقطر) بمعدل 25 بذرة /الطبق وذلك حســـب طريقة Bolkan و Butler (1974) بعد ذلك تم كشف القدرة الامراضية على انبات بذور الباقلاء وحساب شدة الاصابة في الجذور للنباتات النابتة حسب ما ذكر في فقرة مسح تعفن الجذور (2-1) .

2-6عزل وتشخيص بكتريا *leguminosarum* bv. *viciae* *R.* من العقد الجذرية لنبات الباقلاء.

تم قلع النبات الباقلاء بالكامل مع التربة المحيطة بجذوره وبحذر شديد ونقل الى المختبر، ازيلت التربة العالقة بالمجموع الجذري وذلك بغسلها بالماء الجاري ثم فصلت العقد الجذرية التي تمايزت بكبر حجمها ولونها الوردي مع جزء صغير من الجذر المتصل بها كما في الصورة (2) ثم غسلت وعقمت وحسب التعليمات الموصى بها ووضعت على أوراق ترشيح معقمة لإزالة الماء العالق بها ثم هرست العقد مع قليل من وسط Yeast extract Mannitol (YM) لعمل معلق نقل منه 0.1 مل على وسط YMA Yeast extract Mannitol Agar بطريقة التخطيط (streaking) للحصول على مستعمرات منفردة بعد تحضينها بالحاضنة بدرجة حرارة 28±1م^{o} الى حين ظهور المستعمرات البكتيرية(Vincent ، 1981).

صورة 2. العقد الجذرية الفعالة لنبات الباقلاء التي تتصف بكبر حجمها ولونها الوردي المحمر

ثم شخص مظهريا ومجهريا واعتمدت ايضا بالتشخيص الخصـائص الكيموحيويـة والخصـائص الفسـلجية والتـي تشـمل اختبـار النمـو علـى الوسـطYMA واختبـار النمـو علـى وسـط الكونغوالاحمر ووسط البراماثيمول الازرق واختبار تحلل النشا وقدرتها على تثبيت النتروجين واختبار الكاتاليز وقدرتها على انتاج كبريتيد الهيدروجين وتميع الجيلاتين واختبر تحلل اليوريا واختبار الحركة.

2-7الكشف عن الفاعلية التضادية للبكتريا *R. leguminosarum* ضد نمو الفطريات الممرضة *R. solani* (RS-8) ,*M. phaseolina .Solani* (MP-9) *F* (FS-6), المسببة لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء تحت الظروف المختبرية .

تم عمل عالق بكتيري وذلك بعد تحضير المرق المغذي Nutrient broth في 7 دوارق زجاجية وبعد تعقيمها لقحت بعـــزلات البكتريـــا *R. leguminosarum* (RL7-RL1)، حضنت بدرجة حرارة 27م لمدة 5 ايام حيث ظهر النمو بشكل عكورة ، بعدها تم تلقيح اطباق بتري حاوية على وسط PDA الخالي من المضاد الحيوي مع تحريكة حركة رحوية لتوزيع لقحت الاطباق بالفطريات الممرضة وذلك باخذ قرص من حافة المستعمرة الفطرية النامية بواسطة ثاقب فليني قطر 0.5 سم ووضعت في مركز الطبق بمعدل ثلاث مكررات لكل فطر ولقحت اطباق اخرى باقراص فطرية تحوي نفس الوسط وغير ملقحة بالبكتريا لغرض المقارنة وبنفس عدد المكررات، حضنت على درجة الحرارة 25±1 لحين وصول مستعمرة الفطر في معاملة المقارنة إلى حافة الطبق بعدها تم قياس معدل النمو الفطري وحساب النسبة المئوية لتثبيط النمو الفطري على وفق المعادلة التالية:- % للتثبيط=(1- (النمو الفطري في معاملة البكتريا/النمو في معاملة المقارنة))×100 (Montealegre وآخرون ، 2003).

2-8 تأثير البكتيريا *R. leguminosarum* والفطرالاحيائي *Trichoderma viride* والمبيد الكيميائي Beltanal في خفض نسبة وشدة الإصابة بمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء تحت ظروف الظلة الخشبية

أجريت التجربة في الظلة الخشبية التابعة للكلية التقنية/المسيب بإستعمال أصص بلاستيكية قطر 12.5 سم وبمعدل 1 كغم/أصيص وضعت فيها تربة مزيجية مخلوط معها البتموس بمعدل 2: 1 حجم / حجم معقمة بغاز بروميد المثيل وتركت لمدة 15 يوماً قبل الاستعمال، تمت إضافة معاملات التجربة التي شملت 19 معاملة. نفذت التجربة بإستخدام التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized C.R.D Design وبثلاث مكررات لكل معاملة اضيف لقاح الفطر*T. viride* (الذي تم الحصول عليه من قبل أ.د.كامل سلمان جبر كلية الزراعة/جامعة بغداد واختبرت قابليته التضادية ضد الفطريات الممرضة مختبريا حسب طريقةBell واخرون (1982) محملاً على بذور الدخن وبمعدل 1% (وزن/وزن) قبل5 أيام من اضافة الفطر الممرض،أضيف عالق البكتريا *R. leguminosarum* (RL1) الى التربة بحسب طريقة Singh واخرون (2008) مع اجراء بعض التحويرات، اذ تم أضافة 20 مل من العالق لكل اصيص قبل

اضافة الفطر الممرض بثلاثة ايام، كما أضيف المبيد Beltanol ضمن المعاملة المذكورة له بتركيز 1 مل/ لتر بعد يوم واحد من إضافة الفطر الممرض الذي أضيف بنسبة 1% (وزن/وزن) إلى جميع المعاملات التي تتطلب ذلك وتركت معاملة المقارنة بدون أي اضافة (مطلوب ،2012 و دايخ، 2013) . زرعت الأصص ببذور الباقلاء محلية، بواقع 5 بذور/ اصيص. وتمت متابعة التجربة وسقيها كلما دعت الحاجة. أخذت النتائج بعد مرور شهرين من الزراعة بحساب نسبة وشدة الاصابة المجموع الجذري بالمرض وحساب الوزن الطري والجاف للمجموع الجذري والخضري وارتفاع النبات وحجم الجذور.

3-النتائج والمناقشة

3-1المسح الحقلي لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء

أظهرت نتائج المسح (جدول 3) الذي اجري في حقول زراعة نبات الباقلاء وجود وانتشار مرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء في جميع المناطق التي شملها المسح وبنسب إصابة متباينة تراوحت بين 40-100% وشدة إصابة من 26.7-75% وكانت اعلى شدة اصابة في العينات التي اخذت من مناطق جبلة، الطاهرية، المهناوية،مويلحة، قرية الامام المنتظر وناحية الإمام/الصباغية بالتتابع وبنسب إصابة 100% في هذه المناطق. وقد يعود سبب ارتفاع الإصابة في هذه المناطق الى إنها مناطق متخصصة في زراعة الباقلاء إذ يزرع فيها هذا المحصول سنوياً او رداءة بناء التربة التي تجهد جذور النباتات وتجعلها حساسة لمسببات المرضية (EL-Mougy واخرون، 2011). ولا تتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليها (الجبوري، 2002) حيث ان نسبة وشدة الاصابة كانت اعلى ويعزى سبب ذلك الى اختلاف مواقع الحقول التي شملها المسح واختلاف العوامل البيئية لاختلاف موعد اجراء المسح .

جدول 3. نسبة وشدة الاصابة بمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء التي شملها المسح لبعض الحقول في محافظة بابل للموسم الزراعي 2013-2014

رقم العينة	الموقع	نسبة الاصابة%	شدة الاصابة%	رقم العينة	الموقع	نسبة الاصابة%	شدة الاصابة%
1	محرم	40	26.7	9	المهناوية	100	62.8
2	قرية الامام المنتظر	100	52	10	ابي غرق	54	35.3
3	الامام/الصباغية	100	50	11	القاسم/الدروع	73	40
4	البدعة	75	37.5	12	الهاشمية	80	43.3
5	النيل	60	46	13	المدحتية	60	30
6	الطاهرية	100	73	14	العزاوية	61	36.6
7	الوطيفية	83	50	15	مويلحة	100	52.5
8	جبلة	100	75				

3-2عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لجذور وقواعد سيقان الباقلاء:-

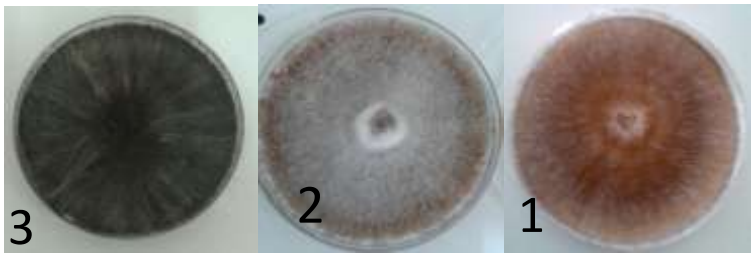
تم عزل وتشخيص أجناس عده من الفطريات من جذور نباتات الباقلاء المصابة بمرض تعفن الجذور وقواعد السيقان وقد تباينت الفطريات *R . solani* و *F. solani* و *M. phaseolina*في الظهور باغلب المناطق وقد سجلت وجودا في معظم العينات، وان هذه النتائج تتفق مع ما ذكره كل من الجبوري (2002) وAbo-shady واخرون(2007) والمسعودي (2012) من ان الفطريات *R . solani* و *F. solani* و*M. phaseolina* تعد من اهم المسببات المرضية لتعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء.

3-3التشخيص الجزيئي Molecular Identification

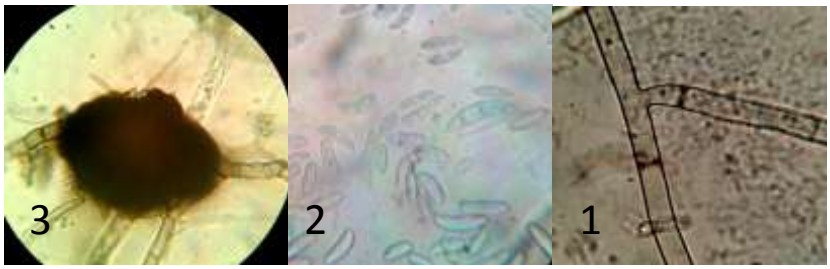
لكون الفحص المظهري والمجهري لا تعطي ادلة كافية وقاطعة للتفريق بين انواع الاجناس الفطرية *R . solani* و *F. solani* و *M. phaseolina* ، ولأهمية التشخيص اذ ينبغي تحديد الجنس والنوع باستعمال طرق معتمدة مثل التشخيص الجزيئي الذي يكون ذا حساسية وتخصصية عاليتين وفقا لتعليمات منظمتي الغذاء والزراعة(FAO) والصحة العالمية (WHO) (Pommerenke، 2011)اجري التشخيص الجزيئي لتأكيد تشخيص العزلات.

4-3 عزل الحامض النووي DNA:

عزل DNA من خلايا عزلات الفطريات المدروسة، ويظهر الجدول (4) تركيز ونقاوة DNA المستخلص، إذ بلغ التركيز 7.5 – 9.8 نانوكرام /مايكروليتر وتراوحت نقاوته ما بين 1.51 – 1.91. ومن قيم التركيز والنقاوة في الجدول(4) والشكل (5) تبين ان DNA المستخلص كان بنقاوة كافية لأجراء تفاعل تضخيم السلسلة (Green وSambrook,2012).



صورة 3. الفطريات الاكثر تكرارا المعزولة من جذور نباتات الباقلاء 1- *R . solani* و2- *F. solani* و3- *M. phaseolina*.

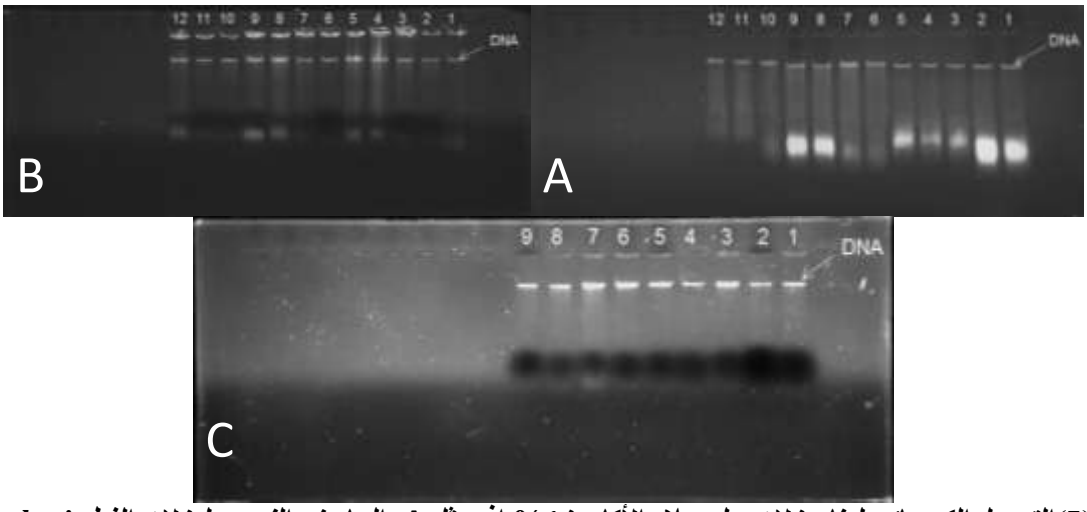


صورة 4. الصفات المجهرية التشخيصة لبعض الفطريات المسببة لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء 1- الصفات التشخيصية للفطر *R. solani* التي تبين زاوية التفرع والتخصر عند منطقة التفرع والحاجز القريب منها، 2- الابواغ الكونيدية الكبيرة والصغيرة للفطر *F. solani*، 3- الجسم الحجري للفطر *M. phaseolina* (X40).

الجدول 4. قيم التركيز والنقاوة في DNA المستخلص من الفطريات الممرضة

ت	رمز العزلة	تركيز DNA نانوكرام /مايكروليتر	نقاوة DNA	ت	رمز العزلة	تركيز DNA نانوكرام /مايكروليتر	نقاوة DNA
1	RS-1	9.8	1.55	6	FS-6	8.3	1.89
2	RS-2	9.3	1.76	7	FS-7	8.1	1.58
3	RS-4	8.8	1.78	8	FS-9	8.3	1.76
4	RS-5	8.7	1.87	9	FS-10	8.6	1.59
5	RS-6	9.1	1.82	10	FS-12	7.5	1.77
6	RS-7	9.3	1.65	11	FS-13	8.2	1.73
7	RS-8	8.9	1.52	12	FS-14	7.8	1.88
8	RS-10	9.0	1.77	1	MP-1	8.4	1.79
9	RS-12	9.3	1.84	2	MP-2	7.9	1,54
10	RS-13	8.8	1.63	3	MP-3	9.1	1.90
11	RS-14	8.2	1.56	4	MP-6	8.4	1.67
12	RS-15	9.4	1.65	5	MP-7	9.5	1.82
1	FS-1	7.9	1.80	6	MP-8	9.6	1.63
2	FS-2	8.1	1.67	7	MP-9	9.2	1.91
3	FS-3	7.7	1.56	8	-13 MP	8.8	1.51
4	FS-4	7.9	1.55	9	-15 MP	8.6	1.66
5	FS-5	8.5	1.81	6	FS-6	8.3	1.89

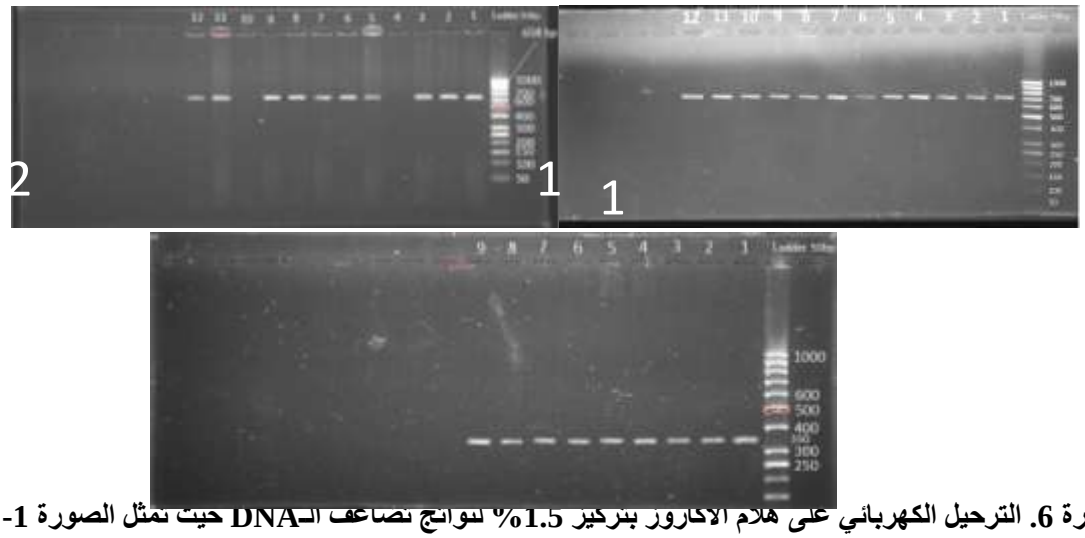
***كل رقم يمثل معدل لمكررين**



صورة (5)الترحيل الكهربائي لدنا عزلات على هلام الأكاروز1% اذ يمثل A .الحامض النووي لعزلات الفطر *R . solani* .
B.الحامض النووي لعزلات الفطر *F. solani* . C .الحامض النووي لعزلات الفطر *M. phaseolina* .

تفاعل تضخيم السلسلة Chain Reaction PCR Polymerase

اظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لتضخيم دنا العزلات للنوع *R . solani* باستخدام الزوج البادیء التشخيصي (ITS1/ITS4) وناتج الهجرة الكهربائية باستعمال الاكاروز بتركيز 1.5% ظهور حزم لجميع العزلات الداخلة في التفاعل بحجم 700bp وهذه النتيجة تؤكد ان الفطر المعزول هو *R . solani* والتي تتضمن 12 عزلة كما هو مبين في الشكل (6-1) وتتفق هذه النتائج مع النتائج التي توصل اليها Helmy واخرون (2015) الذي قام بتشخيص 131 عزلة من الفطر *Rhizoctonia solani* من جذور نبات الباقلاء باستخدام البادئ التسلسلي ITS1-ITS4 وبنفس الوزن الجزيئي. كما اعطت نتائج تضخيم دنا العزلات للنوع *F. solani* باستخدام الزوج البادئ التشخيصي (TEF-/ TEF-F.s4R F.s4f) أدى إلى ظهور حزم ل10 عزلات من اصل 12عزلة والتي تشمل (12,11,9,8,7,6,5,3,2,1) الداخلة في التفاعل بحجم 658bp كما موضح بالشكل (6-2) وهذه النتائج تتفق مع ما حققه Arif واخرون (2012) ان استعمال التقانة الجزيئية باستخدام جهاز ال PCR خفف العناء في تشخيص انواع من الفطريات العائدة الى الجنس *Fusarium* spp. وخاصة النوع *F. solani* والمعزولة من انواع مختلفة من النباتات اذ استخدم الجين TEF-1α الخاص لهذا الغرض. ولوحظ أيضا من خلال هذا التفاعل لتضخيم دنا العزلات للنوع الحامض النووي لعزلات الفطر *M. phaseolina* باستخدام الزوج البادئ التشخيصي (MpKF/MpKR) أدى إلى ظهور حزم لجميع العزلات المستعملة في التفاعل بحجم 350bp وتؤكد هذه النتيجة ان جميع العزلات هي تابعة للفطر *M. phaseolina* كما مبين في الشكل (6-3) وتتفق هذه النتائج مع ما حصل عليها Babu واخرون (2007) من ان استعمال البادئ الخاص بالفطر *M. phaseolina* MpKFI – MpKRI اعطى حزمة لهذا التفاعل بحجم 350bp.



صورة 6. الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% لنواتج تضاعف الـDNA حيث تمثل الصورة 1- لعزلات الفطر *R . solani* (12-1)، 2-عزلات الفطر *F. solani* (12,11,9,8,7,6,5,3,2,1) وعزلات الفطر *M. phaseolina* (9-1)

3-5اختبار المقدرة الأمراضية لبعض الفـطريات المعزولة

3-6الكشف عن العزلات الممرضة باستعمال بـــذور الفجل

اتضح من نتائج الجدول (5) إن جميع عزلات الفطريات المختبرة أدت إلى خفض معنوي في النسبة المئوية للانبات قياساً بمعاملة المقارنة التي بلغت النسبة المئوية لانبات البذور فيها 98.67% وقد تفوقت بعض عزلات الفطر *R . solani* و*F. solani* و *M. phaseolina* التي شملت RS-1، RS-4، RS-5، RS-7، RS-8، RS-10 و FS-3، FS-6، FS-7، FS-14 ، و MP-9، MP-15 بمقدرتها الإمراضية في خفض النسب المئوية للانبات عن باقي العزلات إذ بلغت 0% في حين حققت العزلات الاخرى خفض معنوي بنسبة انبات بنسب متفاوتة تراوحت بين 2.67-57.33% وتتفق هذه النتائج مع ما وجده الجبوري (2002) وجبر والربيعي (2008) وعبدو وآخرون (2012). ان سبب تباين العزلات في تاثيرها الى اختلاف العزلات في مقدرتها على افراز الانزيمات المحللة للبكتين والسيليلوز في المراحل الاولى من الاصابة وهذه الانزيمات تؤدي دوراً في اختراق العائل ومنهاPectinase و methylesterase Pectin وlyase Pectin وCellulase و Phosphatase والتي لها الاثر الكبير في إمراضية الفطر (علوان وفراس، 2010).

3-7 اختبـار تـأثير بعض الفطريـات الممرضـة فـي إنبـات بـذور الباقلاء وبادراتها

استنادا الى نتائج هذه التجربة (الجدول 6) التي اثبتت التفاوت في نسب الانبات والتغاير في شدة الاصابة تم انتخاب عزلة واحدة من كل فطر لاستعمالها في التجارب اللاحقة والتي تشمل R.s-8 و F.s-6 و Mph-9. تشير النتائج الى ان جميع العزلات اظهرت قدرة امراضية عالية في اصابة البادرات ولكنها تباينت في قدرتها الامراضية وهذا يتفق مع ما وجده (جبر 2000 و الجبوري، 2002 والمسعودي 2012و El Gamalو El Shamy ، 2014).

جدول5. الكشف عن العزلات الممرضة المرافقة لجذور وقواعد سيقان الباقلاء المصابة باستعمال بذور الفجل.

المعاملات	نسبة الانبات	المعدل	المعاملات	نسبة الانبات	المعدل
RS-1	0.00	MP-15	0.00	MP-7	24.00
RS-4	0.00	RS-2	0.00	FS-9	25.33
RS-5	0.00	FS-5	0.00	FS-13	25.33
RS-7	0.00	RS-6	0.00	MP-3	25.33
RS-8	0.00	FS-1	0.00	MP-8	25.33
RS-10	0.00	MP-1	0.00	FS-2	29.33
FS-3	0.00	RS-14	0.00	RS-12	30.67
FS-6	0.00	FS-10	0.00	MP-6	44.00
FS-7	0.00	RS-13	0.00	MP-13	57.33
FS-14	0.00	MP-2	0.00	المقارنة	98.67
MP-9	0.00	RS-15	14.67	L.S.D.	7.14

R.S-8 F.s-6 Mph-9 control

صورة 7 . تأثير ثلاث عزلات من الفطـريات الممرضة فـي انبـات بـذور الفجل فـي الوسـط الزرعـي الأكـر والمـاء قياساً بمعاملة المقارنة.

جدول 6. تاثير بعض العزلات الفطرية في انبات بذور الباقلاء

المعاملات	نسبة الانبات	شدة الاصابة%	المعاملات	نسبة الانبات	شدة الاصابة%
RS-5	0.00	100.00	FS-3	46.67	83.33
RS-8	0.00	100.00	FS-5	46.67	80.00
RS-10	0.00	100.00	FS-10	46.67	78.33
RS-4	6.67	98.33	MP-2	46.67	76.67
RS-1	20.00	91.67	FS-1	53.33	76.67
RS-7	20.00	91.67	FS-9	53.33	75.00
RS-13	20.00	91.67	FS-13	53.33	73.33
RS-2	26.67	90.00	MP-6	53.33	73.33
RS-6	26.67	90.00	MP-13	53.33	71.67
RS-15	26.67	90.00	MP-15	53.33	71.67
FS-6	26.67	90.00	FS-2	60.00	70.00
RS-12	33.33	86.67	MP-1	60.00	68.33
RS-14	33.33	86.67	MP-8	60.00	65.00
FS-7	33.33	85.00	MP-7	66.67	58.33
FS-14	33.33	83.33	MP-3	73.33	51.67
MP-5	33.33	83.33	المقارنة	100	3.33
MP-9	33.33	83.33	L.S.D.	26.59	14.89

كل رقم يمثل معدل لثلاثة مكررات

3-8عزل وتشخيص بكتريا *leguminosarum* bv. *viciae*

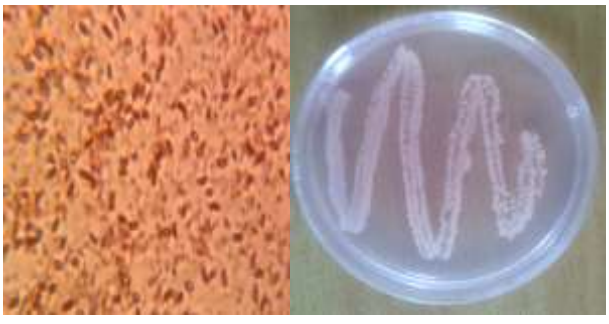
تم الحصول على 7 عزلات محلية من بكتريا viciae *Rhizobium leguminosarum* biovar. عزلت من العقد الجذرية لنبات الباقلاء الناضجة *Vicia faba* L. وكما مبين بالجدول رقم (7).

ظهرت البكتريا بعد زراعتها على وسط YMA بشكل مستعمرات بيضاء اللون ، كثيفة القوام. شخصت البكتريا اعتماداً (Vincent ، 1970) اذ ظهرت الخلايا البكتيرية تحت المجهر الضوئي بعد تصبيغها بصبغة كرام بلون وردي (سالبة لصبغة كرام) عصوية الشكل وكما مبين بالصورة 8.

أما الصفات الكيموحيوية المبينة في الجدول 8 فقد تم تمييز النوع *R. leguminosarum* المعزول من جذور نبات الباقلاء للمناطق اعلاه عن طريق نتائج الاختبارات المبينة بالجدول 16 وهذه النتائج تتفق مع ما جاء بها كل من Nashwaو Mansour (2012) و Deshwal وChaubey (2014).

جدول7. يمثل سلالات البكتريا *R. leguminosarum* المعزولة من بعض مناطق محافظة بابل

المنطقة	محرم	البدعة	النيل	المهناوية	ابي غرق	القاسم	المدحتية
رمز العزلة	1RL	2RL	3RL	4RL	5RL	6RL	7RL



صورة 8.شكل مستعمرات البكتريا البيضاء اللون وقوامها المخاطي على الوسط الزرعي YMA وشكلها بالمجهر الضوئي.

جدول 8. الصفات الكيموحيوية لتشخيص البكتريا *R. leguminosarum*

رقم العزلة	النمو على وسط YMA	كمية النتروجين%	امتصاص صبغة الكونغو الاحمر	صبغة البروموثايمول الازرق	تحلل النشا	تميع الجيلاتين	تحلل اليوريا	الكاتليز	انتاج كبريتيد الهيدروجين
1RL	+	**0.73**	-	+	-	-	-	+	-
2RL	+	**0.77**	-	+	-	-	-	+	-
3RL	+	**0.57**	-	+	-	-	-	+	-
4RL	+	**0.70**	-	+	-	-	-	+	-
5RL	+	**0.63**	-	+	-	-	-	+	-
6RL	+	**0.93**	-	+	-	-	-	+	-
7RL	+	**0.77**	-	+	-	-	-	+	-

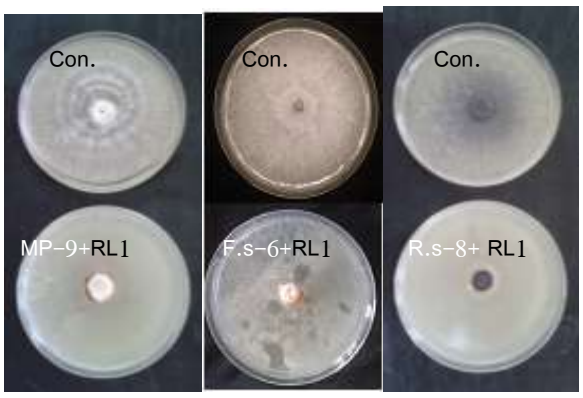
3-9الكشف عن عزلة البكتريا *R. leguminosarum* ذات القدرة التثبيطية العالية للفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA

اوضحت النتائج (الجدول 9) ان جميع عزلة البكتريا *R. leguminosarum* المختبرة احدثت خفضا معنويا في نمو الفطريات الممرضة المسببة للمرض. وبتفوق معنوي للعزلة RL1 التي منعت نمو الفطريات الممرضة بالكامل وبنسبة تثبيط بلغت 100%. ويعود ذلك لعدة اسباب منها ظروف التربة التي تعيش فيها البكتريا وسرعة تكاثرها. ويعود سبب قدرة البكتريا على تثبيط الفطريات المستهدفة الى افرازها للمواد الايضية في الوسط ومنها المضادات الحيوية التي لها القدرة على تحليل هايفات الفطريات ، والانزيمات المحللة للجدران الخلوية وكذلك وجد انها تفرز انزيم البيتا لاكتاميز وهذا يفسر سبب مقاومتها للعديد من مضادات البيتا لاكتام والتي معظمها هي عبارة عن مواد تفرزها الاحياء المجهرية وبضمنها الفطريات كاليات للدفاع عن نفسها في البيئة التي تعيش فيها فضلا عن منافستها على المكان والمواد الغذائية (Chakayabotryو Purkayastha ، 1984 و الطائي والحسو ،2007).

جدول 9. الكشف عن البكتريا ذات القدرة التثبيطية العالية ضد الفطريات الممرضة

المعاملات	نسبة التثبيط	المعاملات	نسبة التثبيط	المعاملات	نسبة التثبيط
RS-8 + RL1	100.00	FS-6 + RL1	100.00	MP-9 + RL1	100.00
RS-8 + RL2	77.78	FS-6 + RL2	85.93	MP-9 + RL2	100.00
RS-8 + RL3	50.74	FS-6 + RL3	67.41	MP-9 + RL3	84.82
RS-8 + RL4	68.52	FS-6 + RL4	69.63	MP-9 + RL4	80.37
RS-8 + RL5	59.63	FS-6 + RL5	78.52	MP-9 + RL5	88.89
RS-8 + RL6	66.67	FS-6 + RL6	71.85	MP-9 + RL6	92.59
RS-8 + RL7	78.15	FS-6 + RL7	81.11	MP-9 + RL7	94.07
RS-8	0.00	FS-6	0.00	MP-9	0.00

كل رقم يمثل معدل لثلاثة مكررات L. S. D عند المستوى 0.05 = 8.16



صورة 9. تأثير البكتيريا *R. leguminosarum* (RL1) في نمو الفطريات الممرضة على الوسط الزرعيPDA

3تأثير البكتيريا *R. leguminosarum* والفطر الاحيائي *T. viride* والمبيد الكيميائي Beltanol في خفض نسبة وشدة الإصابة بمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء تحت ظروف الظلة الخشبية

بينت نتائج التجربة (جدول 10) ان جميع المعاملات التي استخدم فيها عوامل المكافحة ادت الى خفض النسبة المئوية للاصابة وشدتها بمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء، اذ استطاعت البكتريا *R. leguminosarum* خفض نسبة الاصابة بالفطريات الممرضة بنسبة تراوحت بين 53.33-66.67%كما حدثت خفضا معنويا في شدة الاصابة اذ تراوحت بين 15.00-18.33% بوجود الفطر الممرض مقتربة بذلك من كفاءة الفطر الاحيائي *T. viride* الذي سبب خفضا معنويا في نسبة وشدة الاصابة بالفطريات الممرضة *R . solani* و *F.solani* و *M. phaseolina*، حققت نتائج التكامل بين البكتريا الاحيائية *R. leguminosarum* والفطر الاحيائي *T. viride* مع الفطريات الممرضة خفضا معنويا بنسبة وشدة الاصابة اذ بلغت 20% ، 5-10% على التوالي وبدون فروق معنوية حيث تفوقت هذه المعاملة عن باقي المعاملات التي استخدم فيها عامل مقاومة بمفرده ضد الفطر الممرض مقتربة بذلك بكفاءتها عن معاملة المبيد الكيميائي Beltanol والفطريات الممرضة كلا على انفراد الذي اعطى كفاءة في خفض النسبة المئوية وشدة الاصابة التي تراوحت بين 13.33-20.00% و 3.33-5.00%، ولم تختلف معاملة التكامل معنويا عن معاملة المقارنة ومعاملات العوامل الاحيائية بمفردها التي كانت النسبة المئوية وشدة الاصابة صفرا. واشارت النتائج ايضا الى ان الفطريات المسببة لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء لها تاثيرا واضحا في خفض الوزن الطري والجاف للمجوع الخضري والجذري اذ بلغ معدل الخفض في الوزن الطري للمجموع الخضري 0.233،4.007،3.680غم اما الجذري فقد بلغ 1.233،2.633،1.757غم على التوالي ومعدل الوزن الجاف للمجموع الخضري 0.110،0.507،0.427غم على التوالي ومعدل الوزن الجاف للمجموع الجذري 0.077،0.337،0.220غم على التوالي في معاملات الفطريات الممرضة *R . solani* و *F.solani* و *M. phaseolina*، الا ان اضافة العوامل الاحيائية والمبيد الكيميائي تعمل على خفض التاثير السلبي للفطريات المسببة للمرض، اذ حققت معاملة التكامل بين عوامل المقاومة الحيوية اعلاه زيادة في معدل الوزن الطري والجاف في النبات المضافة الى التربة الملوثة بالفطر الممرض وبفروق مظهرية ومعنوية عن باقي المعاملات اذ تراوح معدل الوزن الطري الخضري بين 10.527-14.173غم ومعدل الوزن الطري الجذري بين 11.833-12.040غم اما معدل الوزن الجاف الخضري فقد تراوح بين 1.503-1.587غم وتراوح الوزن الجاف الجذري بين 1.530-1.707غم قياسا بعاملة المقارنة بوجود الفطر الممرض، لقد اظهرت باقي العوامل المضافة بفردها او تكاملا الى التربة الغير ملوثة بالفطريات الممرضة زيادة معنوية في معدل الوزن الطري والجاف للمجموع الجذري والخضري فقد تفوق منها معاملة التكامل بين عوامل المقاومة الحيوية باختلافات مظهرية ومعنوية اذ بلغ الوزن الطري للمجموع الخضري والجذري 15.405،15.167 غم على التوالي، وبلغ معدل الوزن الجاف للمجموع الخضري والجذري 1.883،2.957غم على التوالي قياسا بمعاملة المقارنة بدون اضافة. وينعكس ذلك في زيادة معايير النمو في النبات اذ حققت اعلى معدل لارتفاع النبات وزيادة في حجم الجذور في التربة الملوثة بالفطريات الممرضة المسببة للمرض كان في معاملة التكامل بين بكتريا العقد الجذرية والفطر الاحيائي اذ تراوح ارتفاع النبات بين 30.67-38.00سم ومعدل حجم الجذر تراوح بين 12.67-13.00سم^{3}قياسا بمعاملة المقارنة الفطر الممرض بمفرده، وقد حققت معاملة بكتريا العقد الجذرية المضافة بفردها الى التربة الملوثة بالفطريات تفوق على عامل المقاومة *T. viride* المضافة بمفردها الى التربة الملوثة بالفطريات الممرض التالية *R . solani* و*F.solani* و *M.phaseolina* كلا على حدى اذ بلغ معدل ارتفاع النبات فيها 37.00،29.33،35.33سم ومعدل حجم الجذور 11.33،10.00،12.17سم^3 على التوالي، اما معاملات العوامل الاحيائية بمفردها المضافة الى التربة الغير ملوثة بالفطريات الممرضة فقد حققت تفوقا ملحوظا باختلافات ظاهرية ومعنوية كبيرة خاصة في معاملة التكامل بين عوامل المقاومة الحيوية اذ بلغ معدل طول النبات 40.33سم ومعدل حجم الجذور 26.00سم^3، قياسا بمعاملة المقارنة بدون اضافة التي بلغ فيها معدل طول النبات وحجم الجذور 34.67سم،10.67سم^3 على التوالي.

يعزى التاثير الفعال للمبيد الكيميائي Beltanol كونه من المبيدات التي لها كفائة ضد مدى واسع من الفطريات الممرضة وهذه الفعالية ناتجة عن تكوينه مركبات مخلبية مع النحاس في انسجة العائل مما يسهل مروره الى داخل خلايا الفطريات الممرضة وبعدها يتحرر ويثبط المسبب المرضي (Meister، 2000). اما تاثير البكتريا *R. leguminosarum* في تثبيط الفطريات الممرضة وما يترتب عليه من خفض لنسبة وشدة الاصابة من خلال منافستها على المكان والعناصر الغذائية ولاسيما عنصر الحديد،تشير العديد من البحوث الى ان هذه البكتريا لها القدرة على مقومة العديد من المضادات الحيوية التي هي عبارة عن مواد تنتتج من قبل الاحياء المجهرية وهذا يدل على امتلاكها اليات معينة للمقاومة او تحليل هذه المركبات وهذا يمكنها من النمو وعدم التاثر بالمواد المفرزة من قبل هذه الاحياء في منطقة الرايزوسفير وهذه تعتبر الوسيلة الاولى من وسائل التنافس (الطائي و الحسو، 2007). بين Arfaoui واخرون (2006) ان هذه البكتريا قادرة على تثبيط العديد من الفطريات عن طريق افرازها مواد طيارة من ضمنها غاز Cyanide السام. ويعزى تاثير الفطر الاحيائي *T. viride* كونه له القدرة التضادية على مدى واسع من الفطريات الممرضة عن طريق عدة اليات للمقاومة والتضاد يؤثر فيها سلبا على الممرضات النباتية مثل قدرته العالية في التنافس على

جدول 10. تأثير عوامل المكافحة الاحيائية في نسبة وشدة الاصابة بمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء تحت ظروف الظلة الخشبية

المعاملات	نسبة الاصابة%	شدة الاصابة%	الوزن الطري الخضري	الوزن الطري للمجموع الجذري	الوزن الجاف الخضري	الوزن الجاف للمجموع الجذري	ارتفاع النبات	حجم المجموع الجذري
الفطر R.s-8 بمفرده	100.00	100.00	0.233	1.233	0.110	0.077	3.33	0.33
R.s-8+RL1	66.67	18.33	10.937	12.317	1.250	1.467	37.00	11.33
T.v+R.s-8	46.67	16.67	10.150	11.730	1.117	1.340	36.33	10.00
R.s-8+البلتانول	13.33	3.33	12.363	13.127	1.657	1.673	36.33	8.00
R.s-8+ T.v+RL1	20.00	10.00	12.683	12.040	1.520	1.707	38.00	12.67
الفطر F.s-6 بمفرده	100.00	86.67	4.007	2.633	0.507	0.337	20.33	1.50
F.s-6 + RL1	66.67	16.67	8.890	11.337	1.177	1.653	29.33	10.00
T.v+ F.s-6	40.00	15.00	8.830	10.303	0.967	1.560	26.67	8.33
F.s-6 +البلتانول	13.33	3.33	10.620	8.790	1.140	1.275	29.00	9.00
F.s-6 + T.v+RL1	20.00	5.00	10.527	11.833	1.587	1.530	30.67	13.00
الفطر M.ph-9 بمفرده	100.00	88.33	3.680	1.757	0.427	0.220	19.83	1.50
M.ph-9 + RL1	53.33	15.00	12.297	11.110	1.507	1.213	35.33	12.17
M.ph-9 T.v+	26.67	6.67	10.950	11.023	1.490	1.200	33.67	11.33
M.ph-9 +البلتانول	20.00	5.00	11.823	9.327	1.503	1.080	36.00	9.33
M.ph-9 + T.v+RL1	20.00	6.67	14.173	12.017	1.503	1.543	37.67	13.00
RL1 بمفرده	0.00	0.00	14.487	13.893	1.613	2.057	38.67	19.00
T.vبمفرده	0.00	0.00	14.233	13.387	1.523	2.047	37.67	14.33
T.v+RL1	0.00	0.00	15.407	15.167	1.883	2.957	38.67	15.00
المقارنة(بدون اضافة)	0.00	0.00	10.150	12.933	1.517	1.320	34.67	10.67
L.S.D.	19.09	9.48	3.398	2.853	0.532	0.685	4.34	2.98

* كل رقم بالجدول يمثل معدلاً لثلاثة مكررات .

المغذيات وكذلك انتاجه لانزيمات محللة للجدار الخلايا الفطرية مما يسهل اختراقها مثل انزيم Khare Cellulase(خضير وآخرون،2011). وهنالك عدة اسباب زيادة معايير النمو في بعض المعاملات وخفضها في معاملات اخرى فمثلا يعزى السبب في زيادة معدل ارتفاع النبات إلى دور النتروجين في زيادة تكوين الأحماض الأمينية الضرورية للنمو التي تدخل في تركيب البروتين مما يشجع على الانقسام الخلوي وبالتالي حصول زيادة في النمو ، كما انه يؤدي الى زيادة نشاط

الجبريلينات داخل أنسجة النبات والتي تعمل على زيادة استطالة الخلايا (Lucas de وآخرون ، 2008)، أو قد يرجع الى تداخل هذه العوامل الايجابي في زيادة ارتفاع النبات، واشارت الدراسات والتجارب العديدة إلى اهمية اضافة البكتريا *R. leguminosarum* عند زراعة المحصول البقولي لتحسين نمو النبات وزيادة إنتاجيته باستعمال سلالات معروفة بكفاءتها ومقدراتها على التعايش مع النبات العائل وقابليتها على البقاء والتكاثر في منطقة الجذور وبعد إنبات البذور. (Boddey وHungria، 1997). إن هذه البكتريا تعد احدى اهم المجاميع البكتيرية التي تعرف بالبكتريا المحفزة لنمو النبات PGPR (Roy وMukherjee، 1997). اما الفطر الاحيائي ***T. viride*** فانه يعمل على إنتاج السيدروفور و سيإنيد الهايدروجين و إنتاج الهرمونات مثل الأوكسين والجبرلين و تحويل المواد العضوية والمعدنية إلى صورة ميسرة للنبات اذ إنه له القدرة على إذابة الفسفور وزيادة جاهزيته للنبات (Inglis و Kawchuk، 2002) وهذه النتائج تتفق مع دراسات عديدة في قدرة هذا الفطر على تثبيط العديد من المسببات المرضية للنبات وزيادة معايير النمو (Krupa وآخرون، 2014و Talla وآخرون 2015) .

4-الاستنتاجات والتوصيات

1-4 الاستنتاجات

انتشار مرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء في جميع المناطق التي شملها المسح في محافظة بابل. ان المسببات الرئيسة لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء في حقول محافظة بابل هي الفطريات *Rhizoctonia solani* و *Fusarium solani* و *Macrophomina phaseolina* الذي اكد تشخيصها بواسطة تقانة PCR اذ سجلا انتشارا واسعا في اغلب الحقول بالاضافة الى القدرة الامراضية العالية لها. قدرة الفطريات المسببة لتعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء على اصابة مدى واسع من النباتات. قدرة البكتريا *R. leguminosarum* والفطر الاحيائي *Trichoderma viride* على تثبيط الفطريات المسببة للمرض في الوسط الزرعي PDA. ان استعمال لقاح البكتريا *R. leguminosarum* والفطر الاحيائي *Trichoderma viride* بمفردهما أو تكاملا مع بعضهما وفر حماية لنباتات الباقلاء ضد مسببات هذا المرض وزاد معايير نمو النبات تحت ظروف الظلة الخشبية.

2-4التوصيات

استخدام عوامل المقاومة الحيوية المدروسة متكاملة مع بعضها افضل من استخدامها بمفردها في مقاومة مسببات مرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء. اعتماد برامج مكافحة متكاملة تستعمل فيها العوامل الاحيائية المدروسة ضد المسببات المرضية القاطنة في التربة. الاهتمام بالدراسة حول طبيعة العلاقة بين العائل النباتي وعوامل المكافحة الاحيائية للوصول الى افضل مستوى للمكافحة الاحيائية للمسببات المرضية. نوصي الجهات المعنية بانشاء بنك لحفظ سلالات بكتريا الرايزوبيوم وانتخاب الانواع الكفوءة منها في تحضير مخصبات بيولوجية صديقة للبيئة بوصفها بديلاً عن المخصبات الكيميائية.

5- المصادر

1-5المصادر العربية

الجبوري، حرية حسين شهاب . 2002 . تأثير استخدام معيق النمو كلتارCultar وبعض المستخلصات النباتية على اصابة نبات الباقلاء بمسببات تعفن الجذور . رسالة ماجستير ـ كلية الزراعة ـ جامعة بغداد .84 ص.

الجهاز المركزي للاحصاء.2012. المجموعة الاحصائية السنوية. وزارة التخطيط.العراق.

الطائي ، محمد ابراهيم و الحسو ، محمود زكي (2007) التحري عن بعض انزيمات البيتا لاكتاميز في جرثومة *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae ، مجلة التربية والعلم كلية التربية جامعة الموصل.

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.جامعة الفرات الاوسط.

جاسم ، ناجي سالم .2007. دراسة مرض تعفن جذور وقواعد سيقان محصول الباقلاء المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* (Kuhn) في محافظة البصرة ومكافحته إحيائياً وكيميائياً . أطروحة دكتورا . كلية الزراعة . جامعة البصرة .

جبر ، كامل سلمان. 2000. مسح لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء وتشخيص الفطريات المسببة له ومكافحته حيوياً . المؤتمر العربي السابع لعلوم وقاية النبات .22-26. تشرين أول / أكتوبر. عمان – الأردن.

جبر، كامل سلمان. حميد عباس الربيعي.2008. تاثير الفطر*Rhizoctonia solani* في انبات بذور القطن ومكافحته باستعمال بعض المستخلصات النباتية. مجلة العلوم الزراعية العراقية(4) 39 ،ص 25-37.

خضير، محمد ياسين ومهند محمد نوري و هادي مهدي عبود.2011. دراسة تاثير درجة الحرارة والاس الهايدروجيني على انتاج انزيم Cellulases من الفطر *Trichoderma viride*. مجلة علوم المستنصرية. 22(4).

دايخ، عتاب خير الله.2013. تأثير بعض المستخلصات النباتية و المكافحة الإحيائية للفطريات المرافقة لتدهور النخيل في محافظة ذي قار. رسالة ماجستير. الكلية التقنية المسيب.

عبدو، رانيا حاج، بسام بياعة وعباس عباس. 2012. تحديد المجموعات التشابكية لمجتمع الفطر على البطاطا/البطاطس في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 30: 1-10.

علوان، صباح لطيف و فراس علي الركابي. 2010. تاثير الفطر *Rhizoctoni solani* ورواشحه على انبات بذور ونمو بادرات الباميا ومكافحتها كيمياويا وحيويا. مجلة الكوفة للعلوم الزراعية. 2(1): 6-1.

مطلوب ، عهد عبد علي هادي . 2012 . تحديد مسببات تعفن جذور وقواعد سيقان الفاصوليا وتقويم فعالية بعض عوامل المكافحة الإحيائية في مقاومتها . أطروحة دكتورا. كلية الزراعة . جامعة بغداد

2-5المصادر الاجنبية

Abo-shady,A.M.,Al-ghaffar,B.A.,Rahhal,M.M.H. and Abd-EL M H.A.(2007). Biological Control of Faba Bean Pathogenic Fungi by Three Cyanobacterial Filtrates. Pakistan. Journal. of Biological Sciences 10 (18): 3029-3038

Arfaoui, A.;Sifi, B.; Boudabous, A.; Elhadrami, I. and Cherif, M.(2006). Identification of Rhizobium isolates Possessing antagonistic activity against Fusarium oxysporum F.S.P. ciceris, the causal agent of Fusarium wilt of chickpea. Journal of plant pathology , 75-76، (1) 88.

Arif Mohammad, Shilpi Chawla, N. W. Zaidi , J. K. Rayar M. Variar and U. S. Singh (2012). Development of specific primers for genus Fusarium and F. solani using rDNA subunit and transcription elongation factor (TEF1?) gene. African Journal of Biotechnology Vol. 11(2), pp. 444-447.

Babu, B. K.; Anil K. S.; Alok K. S.; and Dilip K. A. (2007). Identification and detection of Macrophomina phaseolina by using species - specific oligonucleotide primers and probe. Mycologia, 99(6), 2007, pp. 797–803.

Bell , D. K. , H. D. Well and G. R. Markham . (1982) . In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant Pathogens. PhytoPathology . 72 : 379 – 382 .

Bin , L., Alfred , S., Xiaomin , Z. and Donald , L., S. (2002) . In vitro induction of lipo-chitooligosacharide production in *Bradyrhizobium japonicum* cultures by root extracts from non-legumin . Plant Microbial Res. 157 : pp. 1-4.

Boddey , L. H., and Hungria , M. (1997). Phenotypic grouping of Brazilian *Brady rhizobium* strains which nodulate soybean . Biol. Fertil. Soils . 25 : 407-415.

Bolkan, H. H., and E. E. Butler . (1974). Studies on Heterokaryosis Virulence of *Rhizoctonia solani* . Phytopathology . 64: 513 – 522.

Chakayabotry, U. and Purkayastha, R.P. (1984). Role of Rhizobitoxine in protecting Soyabean roots for Macrophomina Phaseolina infection . Gam. J. microbial., 289-295 :30.

de Lucas M, Daviere JM, Rodriguez-Falcon M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blazquez MA, Titarenko E, Prat S (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. Nature 451: 480-484.

Deshwal, V. K. and Chaubey, A. (2014) Isolation and Characterization of Rhizobium leguminosarum from Root nodule of Pisum sativum L. . Journal of Academia and Industrial Research (JAIR) 2(8):464-468.

El Gamal, Nadia G. and El Shamy, Aliaa R. (2014) Allelopathic impact of some antioxidants on Fusarium solani causing root rot on faba bean (Vicia fabae). Journal of Agricultural Technology 10(4):951-961.

El-Mougy, N. S., M. D. I. H. Aly, E. I. Imbabi and M. M. Abdel-Kader. (2011). First Record of *Sclerotinia* Foliage Blight Disease on Pepper under Protected Cultivation System in Egypt. P roc. 12th Egyptian Phytopathological Society, 3-4. ARC, Cairo, Egypt.

FAO. (2006). FAO statistical yearbook 2005-2006, Available at: http://www.fao .org/statistics/ yearbook/vol_1_1/index.asp (online, verified 11 July 2008).

Graham, P.H.; and C.P. Vance .(2003). Legumes : Importance and constraints to

in relation to crop production and utilization. Pp: 35 – 42.

Mazen,M.M., El-Batanony, N. H., Abd El-Monium, M.M. and Massoud, O.N.(2008). Cultural Filtrate of Rhizobium spp. and Arbuscular Mycorrhiza are Potential Biological Control Agents Against Root Rot Fungal Diseases of Faba Bean. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry 3 (1): 32-41.

Mckinney, H.H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by Helminthosporum sativum. J. Agric. Research 26: 195 – 217

Meister, R. T. (2000). Farm chemical Handbook. Listing for " Beltanol ". Willouhg by OH. 86 : 45p.

Montealegre, J. R.; R.Rodrigo; P.M. Luz.; H. Rodrigo; S.polyana; and B. Ximena. (2003). Selection of bioantagonstic bacteria to be used in biological contro of *Rhizoctonia solani* in tomato.J. Biotec. 6:115 –127.

Nashwa, A.H and Mansour, A.A.(2012) Molecular, Biochemical and Physiological characterization of symbiotic bacteria isolated from saline soil in Saudi Arabia. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 6(3): 229-239.

Pommerenke, C.; Musken, M.; Becker, T. and Dotsch, A.(2011). Global genotype phenotype correlation in *Pseudomonas aeruginosa* .Plos. Pathog.6 : 1-8.

Roy, B.K., and Mukherjee.N. 1997. Studies on in vitro antagonism of some bacterial isolates against *Sclerotium rolfsii*.J. Mycopathological-Research 35: (2), 99-105, 14 ref.

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

Singh, B.; Kaur, R. and Singh, K. (2008). Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* greater use .plant physiological 131: 872-877 .

Green, R. M. and Sambrook, J.(2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition. CSHL Press.

Helmy M. M., Gado E., El-Deeb S., Mostafa H. M.. (2015) Phenotypic Diversity and Molecular Identification of the Most Prevalent Anastomosis Group of Rhizoctonia solani Isolated from Diseased Faba Bean Plants. American Journal of Life Sciences. Vol. 3, No. 1, , pp. 47-55.

Icarda ,(2003). : Faba bean Pathology progress report. food Legume Improvement program. ICARDA. Aleppo. Syria.

Inglis, G. and L. Kawchuk. (2002). Comparative degradation of oomycete, ascomycete and basidiomycete cell walls mycoparasitic and biocontrol fungi. Canadian Journal of Microbiology. 48: 60-70.

Kasumbwe, K, Venugopala, K.N, Mohanlall, V. and Odhav, B. (2014). Antimicrobial and antioxidant activities of substituted halogenated coumarins. Journal of Medicinal Plants Research Vol.8(5), pp. 274-281

Krupa P., K. Bandurska; A. Berdowska; M. Myga-Nowak; M. Marczak; A. Godela; S. Bednarek. (2014). Improving the nutritional values of plant products through the use of biological agents such as *Trichoderma viride* in tomato plantations. Journal of Animal &Plant Sciences, Vol.23, Issue 3: 3670 - 3676.

Krupa P., K. Bandurska; A. Berdowska; M. Myga-Nowak; M. Marczak; A. Godela; S. Bednarek. (2014). Improving the nutritional values of plant products through the use of biological agents such as *Trichoderma viride* in tomato plantations. Journal of Animal &Plant Sciences, Vol.23, Issue 3: 3670 - 3676.

Mathews, S.S., and Sparkes,D.L. (2001). The response of wheat to inoculation with the dizatroph *Azorhizobium caulinodans* in aspects of applied biology No. 63 . Plant Microbiol. Interactions: Positive interactions

faba bean in northern NSW. Journal Australasian Plant Disease Notes, 3: 8-9.

Vincent, J. The genus Rhizobium in : starr , M.P.; Stolp,H.;Truper H.G.;Balows, A. And Schilegel, H.G.(eds).(1981)."The Prokaryotes Vol.1, Springer-Verlang,U.S.a Pp. 818-837.

Vincent, J.M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria .I.B.P. Handbook No.15. Blackwell Scientific Publication Ltd.,Oxford.

(fenugreek). African Journal of Biotechnology. 7 (20):3671-3676.

Stojsin, V., Budakov, D., Jacobsen, B., Grimme, E., Bagi1, F. and Jasni, S.2007. Identification of Rhizoctonia solani isolates from Sugar Beet roots by analyzing the ITS region of ribosomal DNA. Proc. Nat. Sci., Matica Srpska Novi Sad. 113,161-171.

Talla, S. G., Raju, A. S. R., Karri, S., & Kumar, Y. S. (2015) Production and antagonistic effect of *Trichoderma* spp. on pathogenic microorganisms (*Botrytis cinerea, Fusarium oxysporium*, *Macrophomina phasealina* and *Rhizoctonia solani*). African Journal of Biotechnology. Vol.14(8), pp. 668-675

Van Leur, J.A.G.; R.J. South well; and J.M. Mackie. (2008). Aphanomyces root rot on