التشخيص الجزيئي للفطر *Rhizoctonia solani* Kühn المسبب المرضي لتعفن جذور البطيخ *Cucumis melo* L. ومكافحته احيائياً

عهد عبد علي هادي مطلوب ايلاف قحطان عباس العامري*

elaf.alameri@yahoo.com

الكلية التقنية المسيب،جامعة الفرات الأوسط التقنية / 51009 قسم تقنيات المقاومة الاحيائية، بابل-العراق.

المستخلص:

أظهرت نتائج العزل من جذور نبات البطيخ المصابة بمرض تعفن الجذور الحصول على 9 عزلات من الفطر *Rhizoctonia solani* والذي شخص الى مستوى الجنس والنوع اعتمادا على صفاته التصنيفية . واكد تشخيص الفطر اعتماداً على تقنية ال Polymerase Chain Reaction (PCR). بينت نتائج الأختبار للمقدرة الأمراضية لعزلات الفطر *R. solani* أختلاف العزلات بمقدرتها الأمراضية و ان جميع العزلات كانت ممرضة للنبات مسببه تعفن للجذور. اتضح من الدراسة ان للبكتريا *B.subtilis* مقدرة تضادية عالية في تثبيط نمو الفطر الممرض *R.solani* حيث بلغت نسبة التثبيط مابين (72.96 – 85.92%). كما حقق الفطر المكافحة الأحيائية *T. harzianum* مقدرة تضادية عالية ضد عزلات الفطر الممرض *R. solani* حيث تراوحت النسبة المئوية للتثبيط مابين (78.99 – 93.66%).بينت نتائج تجربة الظلة الخشبية ، ان المعاملات جميعها أدت الى خفض نسبة وشدة الأصابة بمرض تعفن جذور البطيخ وبتفوق معنوي لمعاملة التكامل بين الفطر *T. harzianum* والبكتريا *B. subtilis* وحامض السالسليك Salicylic acid بلغت نسبة وشدة الاصابه 11.1%و 2.22% على التوالي. كما أدت جميع المعاملات الى رفع معنوي في معايير نمو النبات مقارنةً بمعاملة الفطر الممرض بمفرده.

الكلمات المفتاحية :- البطيخ، تعفن جذور ، الفطر *Rhizoctonia solani* ، الفطر *Trichoderma harzianum*، البكتريا *Bacillus subtilis* ، حامض السالسليك Salicylic acid.

*البحث مستل من رسالة ماجستير للبحث الثاني

Molecular diagnosis of *Rhizoctonia solani* Kühn Caused of melon root *Cucumis melo* L. and its Biological control

Ahed A. H. Matloob Elaf Q. Abbas Alameri*

Abstract:

The results of isolating from the infected plant parts showed the obtaining of 9 isolates of the *Rhizoctonia solani*, which is dignosis based on its taxonomic characteristics. The fungal diagnosis was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) technique to diagnose. The results of the pathogenicity of the isolates *R. solani* differed in their ability to disease of radish and the melon seeds. The study showed that *B. subtilis* had a high degree of resistance of inhibiting the growth of pathogen *R. solani*, where the rate of inhibition was between (72.96 - 85.92%). *T. harzianum* was highly resistant to *R. solani* isolates, with the percentage of inhibition ranged from
78.99 to 93.66%. The results of the wooden canopy showed that all treatments reduced the percentage and severity of melon root rot disease and significantly improved plant growth. the treatment of *T. harzianum*, *B.subtilis* and Salicylic acid, decreased the disease incidence and severity into 11.1% and 2.22% respectively. All treatments caused significant increase in plant growth parameters compared to the treatment of pathogenic fungi alone.

Key words :- Melon, root rot, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, Salicylic acid.

1: المقدمة:

يعد البطيخ *Cucumis melo* L. (Muskmelon) من محاصيل الخضر الصيفية المهمة وتعد الصين اكبر منتجي هذا المحصول (Yang وآخرون, 2007 و Santosواخرون، 2017). بلغت المساحة المزروعة بالبطيخ في العراق 16.57 الف هكتاروبلغ معدل الانتاج

172 الف طن (المنظمة العربية للتنمية الزراعية, 2013). يتعرض محصول البطيخ الى الاصابة بالعديد من المسببات المرضية وفي مقدمتها مرض تعفن الجذور الذي تسببه الفطريات التي تعيش في التربة ومن اهمها الفـــطر *Rhizoctonia solani* محدث خسائر اقتصادية كبيرة في الحاصل كما ونوعا (Stepniewska_Jarosz، 2012 و Sallam وآخرون, 2013). استخدمت عدة طرق لمكافحة مرض تعفن جذور البطيخ ومنها المكافحة الكيميائية لكن وجد ان للمبيدات الكيميائية العديد من التأثيرات السلبية في البيئة وصحة الانسان واحياء غير مستهدفة نتيجة للاستعمال المكثف والخاطئ لهذه المبيدات (Kasumbwe واخرون,2014). لذلك بدا التفكير في البدائل التي من ابرزها استعمال الكائنات الحيـــة الدقيقة في برامج المكافحة الاحيائية لخفض لقاح المسببات المرضية وزيـــادة الإنتاج (Nehal وآخرون, 2014).و يعد الفطر *Trichoderma* spp. من عوامل المقاومة الاحيائية للعديد من مسببات امراض النبات (Simson واخرون, 2017). كما تعد البكتريا *Bacillus subtilis* من الأحياء المجهرية المحفزة لنمو النبات Plant Growth Promoting Rhizo (bacteria PGPR) وتنتج بعض منظمات النمو النباتية وجد بانها تنتج الكثير من المضادات الحيوية منها Subtilin وBacillomycin والانزيمات ومنها انزيم Chitinase وتعمل هذه المضادات والانزيمات على تحلل جدران الفطر *R.solani* و فطريات التربة الممرضة (Ardakani واخرون،2011 و Shoaei واخرون، 2012). ولقلة الدراسات المتعلقة في استخدام عوامل المكافحة الأحيائية في مكافحة مرض تعفن الجذور لنبات البطيخ هدفت الدراسة الى عزل وتشخيص مسبب مرض تعفن جذور البطيخ ودراسة تأثير بعض عوامل المقاومة الأحيائية والمستحث الكيميائي مفردة او متكاملة مع بعضها في مقاومة مسبب مرض تعفن جذور البطيخ.

2: المواد وطرائق العمل:

1:2 المسح الحقلي لمرض تعفن جذور البطيخ في محافظة بابل.

تم اجراء المسح الحقلي للموسم الزر اعي 2015 – 2016 في 9 مناطق مختلفة في محافظة بابل شملت هذه المناطق كل من ناحية جبلة ومنطقة الطاهرية و مويلحة والمحاويل والقاسم والكفل والنيل والطهمازية والمهناوية لتحديد مدى انتشار مرض تعفن جذور نبات البطيخ في محافظه بابل وقد تراوحت مساحة الحقول المزروعة مابين 1ـــ4 دونم (جدول 1). جمعت العينات من النباتات التي ظهرت عليها اعراض الاصابة المتمثلة بضعف عام بالنمو واصفرار الاوراق وذبول النبات مع ملاحظة وجود تعفنات ذات لون بني على الجذور الرئيسة والفرعية. اخذت العينات لكل حقل عشوائيا بطريقة تقاطع الاقطار وحسبت النسبة المئوية للاصابة بأخذ 10 نباتات ومن المناطق المختلفة. حفظت في الثلاجة تحت درجة حرارة 4 مْ لحين عزل الفطريات المرافقة للجذور من كل عينة وتم حساب النسبة المئوية للاصابه لكل حقل بأستعمال المعادلة التالية:-

النسبة المئوية للاصابة=(عدد النباتات المصابة/ عدد النباتات الكلية المفحوصة)X 100%

حسبت النسبة المئوية لشدة الاصابة للمجموع الجذري وفقا للدليل المرضي المكون من 5 درجات وكما يلي :-

0= جذور سليمة. 1= تلون (تعفن) الجذور الثانوية. 2= تلون الجذور الثانوية وجزء من الجذر الرئيسي. 3= تلون الجذر الرئيسي دون تعفن قاعدة الساق. 4= تلون الجذر الرئيسي وتهرؤه وتعفن قاعدة الساق. 5= موت النبات.

وقد حسبت النسبة المئوية لشدة الاصابة حسب معادلة Mckinney (1923) وكما يلي:-

%لشدة الإصابة= [(عدد النباتات في الدرجة0 ×0) + (عدد النباتات في الدرجة1 ×1) +.....+ (عدد النباتات في الدرجة5 ×5)/ مجموع النباتات المفحوصة × 5] %100X

جدول (1): التوزيع المكاني والزماني لمسح مرض تعفن جذور البطيخ في بعض مناطق محافظة بابل

رقم العينة	منطقة الجمع	مساحة الحقل\ دونم	تاريخ الجمع
1	ناحية جبلة	2	10 \ 7 \ 2016
2	الطاهرية	1	17 \ 7 \ 2016
3	مويلحة	2.5	25 \ 7 \ 2016
4	قضاء المحاويل	3	28 \ 7 \ 2016
5	ناحية القاسم	1	5 \ 8 \ 2016
6	مركز الحلة\الطهمازية	2	11 \ 8 \ 2016
7	ناحية النيل	2.5	24 \ 8 \ 2016
8	ناحية الكفل	1	26 \ 8 \ 2016
9	المهناوية	4	3 \9 \ 2016

عزل وتشخيص الفطر *R. solani* من جذور نباتات البطيخ المصابة

تمت عملية العزل من الأجزاء النباتية المصابة (الجذور ومناطق الساق القريبة منها) بأستعمال أطباق بتري تحوي على الوسط الغذائي Potato Dextrose Agar (PDA) المضاف له المضاد الحيوي Tetracycline بتركيز 200ملغم/لتر. وتمت متابعة نمو الفطريات، وبعد ثلاثة أيام من التحضين على درجة الحرارة 25±1 مº تم إجراء الفحص لمستعمرات الفطريات النامية وذلك بأخذ أجزاء صغيرة من كل مستعمرة فطرية وفحصها تحت المجهر. وقد تم تنقية مستعمرات الفطر *R. solani* النامية في الأطباق وذلك بنقلها إلى أطباق جديدة حاوية على الـ PDA وحضنت الأطباق لمدة أربعة أيام وشخص الفطر اعتمادا على الخصائص الاتيه:-

الخصائص المظهرية والمجهرية اذ تم تشخيص الفطر لمستوى الجنس والنوع, اعتمادا على صفات المستعمرة الفطرية وطبيعة الغزل الفطري والتراكيب التي تكونها وباستخدام المفاتيح التصنيفية المعتمدة (Parmeter وWhitney، 1970).

الخصائص الجزيئية والتشخيص بطرائق العمل الخاصة بتقنية الـ PCR

اولا: استخلاص الحامض النووي DNA وتنقيته

تم استخدام عزلتين من الفطر *Rhizoctonia solani* التي سبق عزلها من جذور البطيخ المصابة في محافظة بابل , اذ استخدم Kit الخاص بالاستخلاص من شركة Geneaid (Reagent Genomic DNA Kit).

ثانيا: الكشف عن الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA)

استخدمت طريقة الترحيل الكهربائي Electrophoresis باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1%للكشف عن الحامض النووي منقوص الاوكسجين وكانت المحاليل المطلوبة هي: Agarose، TBE buffer، Bromophenol blue، Ethidium bromideتم الكشف عن الحامض النووي منقوص الاوكسجين حسب طريقة Sambrook واخرون (1989) والتي تتضمن ثلاث مراحل هي:

أ: تحضير هلام الاكاروز Preparation of Agarose Gelوضع 100 مل من دارئ TBE buffer في بيكر.وزن 1 غم من الاكاروز واضيف الى الدارئ.وضع الدارئ على Microwave الى حد الغليان بحيث ان جميع مكوناته اذيبت.رفع الجل من الـ Microwave- وترك ليبرد الى درجة حرارة 50-60 مُ.اضيف له 5 مايكروليتر من Ethidium bromide.

ب: تحضير قالب هلام الاكاروز Preparation of Casting Agaroseوضع المشط في احدى النهايتين لقالب هلام الاكاروز.صب الاكاروز بعد سد نهايتي القالب بوساطة شريط لاصق لكي لا يتسرب الاكاروز الجوانب وتركه ليبرد بدرجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة.وضع القالب في تجويف الترحيل الكهربائي بعد رفع المشط بدقة عالية.وملء تجويف الترحيل الكهربائي بمحلول TBE buffer بحيث يرتفع عن سطح الهلام بمقدار 3 ملم.

ج: الاضافات (وضع الحامض النووي منقوص الاوكسجين وسريانه في هلام الاكاروز)اضيف 9 مايكروليتر من الحامض النووي منقوص الاوكسجين الى 3 مايكروليتر من صبغة الـ DNA Loadingdye اي بنسبة 3:1 ثم وضعت في الحُفر في هلام الاكاروز.رُبطت الاقطاب بصورة مناسبة بحيث يُربط

القطب الموجب بالموجب الموجود بمجهز الطاقة لجهاز الترحيل الكهربائي والقطب السالب بالسالب. شُغل جهاز الترحيل الكهربائي بفولتية 90 ملي امبير لمدة 30 دقيقة.وُضع هلام الاكاروز على وحدة الاشعة فوق البنفسجية UV–Transilluminator وفُحص تحت الاشعة فوق البنفسجية لملاحظة حزم الـDNA المتداخلة مع صبغة Ethidium bromide.

ثالثا: طريقة عمل تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

استخدمت تقنية الـ PCR لتضخيم مناطق التفاعل باستخدام البادئ المذكور في الجدول (2). اجريت طريقة العمل بحجم 20 مايكروليتر وكما موضح في الجدول (3) اعتمادا على النشرة المرفقة في Master Mix المصنع من شركة Bioneer.

جدول (2): بعض الصفات الخاصة بالبادئ الذي تم استخدامه للكشف عن الفطر

حجم الحزمة التي تنتجه (bp)	تسلسل النيوكليوتيدات من5′ الى 3′	اسم البادئ	اسم الفطر
700	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'	ITS1f	*R. solani*
	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	ITS4r	

جدول (3): احجام المواد الكيمياوية المستخدمة في التفاعل.

المواد الكيميائية	الحجم
Master Mix	5 µl
Primer forward	2.5 µl
Primer ReveR.se	2.5 µl
DNA	5 µl
Nuclease – Free Water	اكمل الحجم الى 20
Total	20 µl

بعد اتمام الاضافات جميعها مُزجت العينات مركزيا بوساطة جهاز الطرد المركزي الخاص بانابيب PCR ونقلت العينات الى جهاز الPCR من نوع Cycler (Eppendorf Master Hambrug, Germany)

اجري تفاعل تضخيم السلاسل DNA العزلات *R. solani* اعتمادا على البرنامج الموصوف من قبل (Hsiang و 2001, Dean و Stojsinواخرون,2007) وكما مبين بالجدول (4).

جدول (4): برنامج عمل الجهاز الخاص بالبادئ المخصص للفطر *Rhizoctonia solani*

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

اختبارات المقدرة الامراضية :-

الكشف عن العزلة الممرضة بأستعمال بذور الفجل:-

اختبرت المقدرة الأمراضية لعزلات الفطر *R. solani* التي عزلت من الجذور المصابة لنبات البطيخ كما جاء في طريقة Bolkan و Butler (1974) زرعت الاطباق الحاوية على النموات الفطرية المختبرة (النامية على وسط اكر الماء) ببذور فجل محلي معقمة سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بواقع 25 بذرة/ طبق بصورة دائرية قرب حافة الطبق وبمسافات متساوية

تقريبا حضنت الاطباق تحت درجة حرارة 25±1 مْ لمدة 7 ايام بعدها حسبت النسبة المئوية لإنبات البذور.

اختبار تأثير الفطر *R. solani* في انبات بذور نبات البطيخ

نفذت هذه التجربة في الكلية التقنية/ المسيب اذ انتخبت عزلات الفطر *R. solani* والتي شملت العزلات (R.S1, R.S3, R.S6, R.S8, R.S9) اضيف لقاح الفطر المحمل على بذور الدخن المحلي (Dewan ، 1989) الى تربة مزيجية معقمة في جهاز المؤصدة لمدة نصف ساعة (ليومين متتاليين) وثم تكشف التربة للتخلص من الغازات السامة الناتجة اثناء عملية التعقيم . وزرعت اصص بلاستيكية سعه 2كغم وبنسبة 1% (وزن/وزن) زرع بكل اصيص 5 بذور من نبات البطيخ معقمة سطيحا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم (1% كلور حر) كررت كل معاملة 4 مرات وتركت 4 مكررات من دون اضافة الفطر الممرض كمقارنة وسقيت الاصص بحذر شديد, حسبت النسبة المئوية للأنبات بعد 8 ايام من الزراعة بعد اكتمال انبات بذور معاملة المقارنة كما حسبت شدة الأصابة اعتمادا على الدليل المرضي والمعاملة سابقة.

اختبار المقدرة التضاديةللفطر الأحيائي *Trichoderma harzianum* ضد الفطر الممرض *Rhizoctonia solani* على الوسط الزرعي PDA.

تم أختبار المقدرة التضادية للفطر الأحيائي *T. harzianum* ضد الفطر الممرض *R. solani* المعزول من جذور نبات البطيخ باعتماد طريقة الزرع المزدوج , أذ حضر وسط PDAوعقم في جهاز المؤصدة تحت ظروف التعقيم المذكورة في الفقرات السابقة وصب في اطباق بتري معقمة قطر 9سم وبعد تصلب الوسط قسم كل طبق بتري الى قسمين متساويين ولقح مركز النصف الاول بقرص قطرة 0.5 سم اخذ بواسطة ثاقب الفلين من الوسط الغذائي النامي علية الفطر التضادي*T. harzianum* بعمر7 أيام اما مركز النصف الاخر فقد لقح بقرص مماثل من النمو الفطري لعزلة الفطر الممرض (R.S6) بعمر7 ايام على التوالي والمنمى ايضا على الوسط الزرعيPDA ، بأربعة مكررات مع معاملة المقارنة اذ لقحت بالفطر الممرض فقط ووضعت الاطباق في الحاضنة تحت درجة حرارة 25±1مْ وبعد وصول نمو الفطريات الممرضة الى حافة الطبق تم تقدير التضاد حسب مقدار امتداد النمو الفطري لكل مستعمرة وتم تقدير معدل التضاد للفطر الممرض حسب مقياس Bell وأخرون(1982) والمكون من 5 درجات كما يأتي :درجة 1- الفطر التضادي يغطي مساحة الطبق بكاملة.درجة 2– الفطر التضادي يغطي ثلثي مساحة الطبق.درجة 3- الفطر التضادي والفطر الممرض يغطي كل منهما نصف الطبق.درجة 4- الفطر التضادي يغطي ثلث مساحة الطبق والفطر الممرض يغطي ثلثي مساحة الطبق.درجة 5- الفطر الممرض يغطي مساحة الطبق بكاملة.ويعد العامل الاحيائي فعالاً من الناحية التضادية عند اظهار درجة تضاد 2 او اقل مع عزلة الفطريات الممرضة قيد الدراسة.

اختبار المقدرة التضادية لبكتريا *B. subtilis* ضد الفطر *Rhizoctonia solani*على الوسط الزرعي PDA

اختبرت القابلية التضادية *B. subtilis* ضد الفطر الممرض *R.solani*على الوسط الزرعي PDA عن طريق اضافة 1مل من عالق العزلة البكتيرية المنماة على وسط N.B) Nutrient Broth)عمر 5 ايام في وسط طبق بتري حاو على الوسط الزرعي PDA مع تحريكة حركة رحوية لتوزيع العالق بصورة متجانسة وضع قرص قطر 0.5 سم من مزرعة الفطر بعمر 7 ايام في مركز الطبق, استعملت 4 اطباق من دون اضافة البكتريا كمقارنة. حضنت الأطباق (25±1 مْ لمدة 7 ايام) (Fatima واخرون, 2009). تم حساب معدل نمو الفطر الممرض والنسبة المئوية للتثبيط حسب المعادلة الاتية:-

% لتثبيط النمو الفطري = [1– (النمو الفطري في معاملة البكتريا / النمو الفطري في معاملة المقارنة)] × 100

تقييم كفاءة بعض العوامل الأحيائية والتكامل بينها والمبيد Beltanol في حماية نبات البطيخ من الاصابة بمرض تعفن الجذور تحت ظروف الظلة الخشبية:-

اجريت هذه التجربة في الظلة التابعة الى الكلية التقنية/ المسيب بأستعمال اصص بلاستيكية سعه 2 كغم حاوية على تربة مزيجية معقمة بالمؤصدة, أضيف لقاح الفطر الممرض *R. solani* المحمل على بذور الدخن المحلي (Dewan ، 1989) بمعدل 10غم واضيف عالق البكتريا بمعدل 10مل لكل اصيص قبل 3 ايام من الزراعة, كما اضيف المبيد Beltanol ضمن المعاملة المذكورة له بتركيز 1مل/لتر (حسب ما موصى به من قبل الشركة المنتجة) بعد يوم واحد من اضافة الفطر الممرض 1% (وزن/وزن) الى جميع المعاملات التي تتطلب ذلك، واضيف لقاح الفطر الأحيائي *T. harzianum* محملا على بذور الدخن قبل 3 ايام من وتركت معاملة المقارنة بدون اي اضافة واستعملت المعاملات كما يلي:-1- الفطر الممرض *R. solani* *بمفرده* (*R.s*6).2- الفطر الممرض (*R.s*6) + الفطرالأحيائي (*T.h*).3-الفطر الممرض (*R.s6*) + البكتريا (*B.s*).4- الفطر الممرض (*R.s6*) + حامض (Sa).5-الفطر الممرض (*R.s6*) + الفطر الأحيائي (*T.h*) + البكتريا (*B.*s).6- الفطر الممرض (*R.s*) + الفطرالأحيائي (*T.h*) + حامض (Sa).7- الفطر الممرض (*R.s6*)+ البكتريا (*B.s*) + حامض (Sa).8-

الفطر الممرض (*R.s6*) + الفطر الأحيائي (*T.h*) + البكتريا (*B.s*) + حامض (Sa).9- الفطر الممرض (*R.s6*) + المبيد (Bel)Beltanol.10-المقارنة بدون أي اضافة11- الفطر الأحيائي*T. harzianum* بمفردة (*T.h*).12-البكتريا *B. subtilus* بمفردها.13- حامض السالسليك Salcylic acid بمفردة (Sa).14- الفطر الأحيائي (*T.h*) + البكتريا (*B.s*).15-الفطر الأحيائي (*T.h*) + حامض (Sa).16-البكتريا (*B.s*) + حامض (Sa).17- الفطر الأحيائي (*T.h*) + البكتريا (*B.s*) + حامض (Sa). زرعت الاصص ببذور نبات البطيخ المحلية بواقع 5 بذور في كل اصيص وتمت متابعة التجربة وسقيها كلما دعت الحاجة. اخذت النتائج بعد مرور شهرين من الزراعة وبحساب نسبة وشدة اصابة المجموع الجذري بمرض تعفن جذور البطيخ, وجرى قياس الوزن الطري والجاف للنباتات.

تصميم وتحليل التجارب

نفذت التجارب المختبرية وتجارب الظلة الخشبية بأستخدام التصميم العشوائي الكامل (Complete Randomized Design (C.R.D) وبثلاثة مكررات لكل معاملة، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي (L.S.D=0.05.). واستعمل البرنامج Genstate في التحليل الاحصائي للتجارب.

النتائج والمناقشة:-

المسح الحقلي لمرض تعفن جذور البطيخ:-

بينت النتائج (جدول5) وجود مرض تعفن جذور البطيخ في جميع المناطق التي شملها المسح في محافظة بابل وبنسب اصابة تتراوح بين 60-86% وشدة اصابة تراوحت بين 30 –69% وكانت اعلى نسبة اصابة في المناطق المهناوية و جبلة والطهمازية والتي بلغت79,84,86 % على التوالي وقد يعود سبب ارتفاع الأصابة في هذه المناطق الى انها مناطق متخصصة في زراعة البطيخ اذ يزرع فيها المحصول سنويا مما ادى تراكم لقاح الفطريات الممرضة وبشكل خاص الاجسام الحجرية Sclerotia التي تبقى في التربة لمدة طويلة قد تصل الى خمس سنوات (Lucas واخرون، 1985 و Su واخرون,2001) وقد يعزى سبب الأختلاف في نسب الأصابة بين المناطق للتباين في العمليات الزراعية وفي نوع وطريقة اضافة الأسمدة العضوية والكيميائية. ومن المعروف ان العوامل البيئية من رطوبة وحرارة لها تأثير كبير في زيادة لقاح الفطر وكذلك زيادة القدرة الأمراضية للفطريات اذ ان كل هذه العوامل هي مؤثرة في النبات مما تجعله اكثر حساسية للأستجابة للممرضات النباتية, كما اظهرت النتائج ان اقل نسبة اصابة في عينات منطقة المحاويل والقاسم ويعزى السبب كون ان هذه المناطق زرعت بالمحصول لأول مره فضلا عن اهتمام بعمليات خدمة التربة والمحصول.

جدول 5. المسح الحقلي لمرض تعفن جذور البطيخ لبعض الحقول في محافظة بابل للموسم الزراعي 2015 -2016

رقم العينة	الموقع	مساحة الحقل/ دونم	نسبة الإصابة (%)	شدة الإصابة (%)
1	ناحية جبلة	2	84	69
2	منطقة الطاهرية	1	77	58
3	منطقة مويلحة	2.5	70	52
4	قضاء المحاويل	3	64	30
5	ناحية القاسم	1	60	44
6	الطهمازية	2	79	55
7	قضاء النيل	1.5	80	52
8	ناحية الكفل	1	80	64
9	منطقة المهناوية	4	86	48

عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لجذور البطيخ المصابة:-

بينت نتائج العزل من جذور نباتات البطيخ المصابة ان الفطر *R. solani* كان اكثر الفطريات تكراراً اذ ظهر في جميع العينات بنسبة 81.44%. وبينت نتائج التشخيص (جدول6) وجود العديد من الفطريات المرافقة لجذور البطيخ وبتكرار اقل مثل *Rhizopus* spp. و*Aspergillus* spp.و*Mucor* spp. وكذلك وجود الفطر *Trichoderma* spp. والفطر *Fusarium oxysporium* و*Penicillium* spp.. والفطر *Fusarium solani* وقد يعزى وجود هذه الانواع من الفطريات الى نموها وتغلغل غزلها الفطري داخل الأنسجة النباتية المتحللة التي اصيبت سابقا بالفطريات المسببة لتعفن الجذور مما وفر لها حماية من

المعقم السطحي. امتازت عزلات الفطر *R.solani* بتكوينها مستعمرات ذات لون بني الى بني فاتح وتباينت بسرعة تكوينها للأجسام الحجرية ذات اللون الداكن وكثافة الغزل الفطري المكون من خيوط فطرية سميكة تتفرع بشكل زاوية قائمة واحتواء الغزل الفطري على تخصرات عند منطقة نشوء التفرع وتكوين حواجز في الفروع قرب منطقة النشوء (صورة 1)(Parmeter وWhitney، 1970و Sneh اخرون،1996).

جدول6. الفطريات المرافقة لجذور البطيخ المصابة واماكن وجودها ونسب تكرارها في العينات.

اسم الفطر العلمي	رقم العينة*	%لتكرار الفطر في العينات**	
		أعلى نسبة	المعدل
Rhizoctonia solani Kuhn	1-9	97	81.44
Fusarium solani (Mart) Sacc.	1,5,9	44	37
Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid	1,6	50	42.33
Rhizopus sp.	4	27	22.22
Aspergillus niger Van Tieghem	1,2,3,6,9	55	48.77
Aspergillus flavus	3,5	26.19	19.44
Trichoderma harzianum Rifai	1,4,6,7,8	65	52.11
Penicillum spp.	3,8	28	24.77
Mucor spp.	7,2	15	10.77
Fusarium oxysporum Schlecht	7,4	37	28.77

*الأرقام تمثل مناطق جمع العينات (جدول1)

**لتكرار الفطر في العينة=$\frac{\text{عدد القطع النباتية التي فيها الفطر في الأطباق}}{\text{العدد الكلي للقطع المستعملة في العينة}}\times 100$

صورة (1): مستعمرة الفطر *Rhizoctonia solani* الأكثر تكراراً المعزول من جذور نباتات البطيخ النامي على الوسط الزرعي PDA، A: مستعمرة الفطر *R. solani* بعمر أسبوعB: مستعمرة الفطر *R. solani*بعمر أسبوعين وتكوين الاجسام الحجرية C: الصفات التشخيصية المجهرية للفطر *R. solani* التي تبين زاوية التفرع والتخصر عند منطقة التفرع والحاجز القريب منه (×100).

التشخيص الجزيئي Molecular Identification

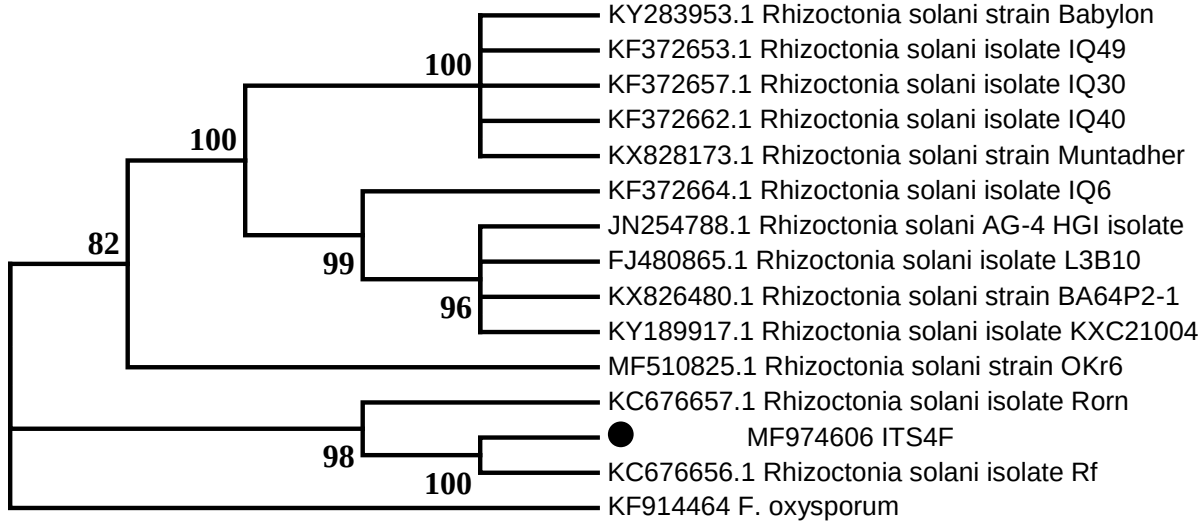
طريقة عمل تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

أظهرت نتائج تضخيم تفاعل البلمرة المتسلسل لتضخيم الحامض النووي DNA لعزلة الفطر *R. solani* ان استخدام الزوج البادئ التشخيصي (ITS4 / ITS1) أدى الى ظهور عزلة الفطر في تفاعل تضخيم السلسلة بحجم 700 bp كما موضح في الصورة 2 وهذا هو الحجم المتوقع الذي ينتجه الزوج من البادئات وهذه النتيجة تؤكد ان الفطر المعزول هو *R.solani*. وتتفق هذه النتائج مع تلك النتائج التي توصل اليها Helmy واخرون (2015) الذي قام بتشخيص 131 عزلة من الفطر *R. solani* بأستخدام البادئ التسلسلي ITS1-ITS4 وبنفس الوزن الجزيئي.

صورة 2. الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز 1% لنواتج تضاعف الـDNA حيث تمثل الصورة عزلة الفطر *R. solani*

تحديد تعاقبات القواعد النتروجينية Sequencing.

بينت نتائج تعاقب القواعد النتروجينية (جدول 2 وشكل 1) اصطفاف تسلسلات القواعد النيتروجينة الجزئية لجين 18S ribosomal RNA للعزلة العراقية ITS4F قيد الدراسه مع نظيراتها المسترجعة من بنك الجينات العائده لفطر *R.solani* يمثل الصف السفلي تسلسل القواعد النيتروجينية العائده لفطر *Fusarium oxysporum*.



شكل 2 شجرة الأصول الوراثية.

شجرة الاصول الوراثية من نوع الضامة بالتجاور Neighbor-Joining تم بناؤها باستعمال التسلسلات النيوكليوتيديه لمنطقه 18S RNA تظهر العلاقات الوراثية بين عزلة محافظة بابل قيد الدراسة المؤشرة ازاؤها بالرمز (•) والعزلات العراقية و العالمية المكافئة لها المسترجعة من بنك الجينات. تم اجراء هذه المقارنة باستعمال برنامج MEGA6.

الرمز البنكي في بنك الجينات.

تم وضع رمز بنكي خاص بالعزلة *R. solani* المعزولة من جذور نبات البطيخ المصابة في محافظة بابل والرمز البنكي هو MF974606 ITS4F BankIt2048227

الكشف عن العزلات الممرضة باستعمال بذور الفجل

اوضحت النتائج ان جميع عزلات الفطر *R.solani* المختبرة سببت خفضاً معنويا في النسبة المئوية لأنبات بذور الفجل. ولوحظ هناك تباين في المقدرة الأمراضية لعزلات الفطر (جدول7) اذ تفوقت العزلات R.s-1 وR.s-3 و R.s-6 وR.s-9 بمقدرتها الأمراضية على بقية العزلات والتي كانت واضحة في التأثير في خفض النسبة المئوية للأنبات اذ منعت انبات البذور بشكل كامل قياسا بمعاملة المقارنة التي كانت نسبة المئوية للأنبات 100%. في حين حققت العزلات الأخرى خفضا معنويا بنسب متفاوتة في أنبات بذور الفجل التي تراوحت بين 4.00, 22.67 , 12.00 , 18.67 , 28.00%. ان سبب تباين العزلات في تأثيرها في النسبة المئوية لأنبات بذور الفجل وقد يعود للأختلاف الوراثي بين عزلات االفطر التي جمعت من مناطق مختلفة وبالتالي اختلاف العزلات في مقدرتها على افراز الأنزيمات التي تؤدي دورا في اختراق العائل وتحليل مكوناته ومنها Pectinase و Pectin lyase و Pectin methylesterase و Cellulase و Phosphatase والتي لها الأثر الكبير في امراضية الفطر (Anne واخرون،2002).

الجدول 7. اختبار المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *R. solani* بأستعمال بذور الفجل

العزلات المختبرة للفطر(*R. solani*)	% للأنبات	العزلات المختبرة للفطر(*R. solani*)	% للأنبات
R.S-1	0.00	R.S-6	0.00
R.S-2	4.00	R.S-7	18.67
R.S-3	0.00	R.S-8	28.00
R.S-4	22.67	R.S-9	0.00
R.S-5	12.00	المقارنة	100
قيمة LSD* ($P<0.05$).	7.281 *		

*R.s= *Rhizoctonia solani* والعدد بالقرب من الرمز يمثل رقم العزلة

اختبار تأثير الفطر *R. solani* في انبات بذور نبات البطيخ.

اشارت نتائج (الجدول 8 و9)الى ان جميع العزلات المختبرة من الفطر *R. solani* قد احدثت خفضا معنويا بنسبة انبات بذور البطيخ. اذ بلغت النسبة المئوية للأنبات في معاملة العزلة R.S-6 0.00بعد 10 ايام من الزراعة قياسا بمعاملة المقارنة دون اضافة الفطر الممرض والتي كانت نسبة الانبات فيها 100%. كما سببت العزلة شدة اصابة بمقدار 100.0% قياسا بمعاملة المقارنة وهذا يعد من من الاعراض المرضية المميزة اذ يهاجم الفطر *R. solani* بذور العائل النباتي ويسبب تعفنها ومنعها من الانبات علاوه على ذلك فأنه يهاجم البادرات قبل البزوغ مما يحدث خفضا كبيرا بنسب انبات البذور من خلال قتل البذور او اضعاف البادرة وتأخير بزوغها (Mohamed واخرون, 2014). ويحدث تعفن جذور وتقرح وتخصر قواعد سيقان البادرات بالقرب من سطح التربة ممايسبب سقوط البادرات وموتها اما باقي العزلات من الفطر *R. solani* فقد تفاوتت في نسبة انبات بذور البطيخ بفروق معنوية اذ كانت53.33 , 33.33 .20.00% وشدة الاصابة تراوحت 77.33 , 88.00% يعود سبب ذلك الى الأختلاف في قدرة العزلات على افراز الأنزيمات المحللة مثل انزيم Cellulase و Pectinase علاوة على مواد اخرى مهمة ذات تأثير سام مثل Phenyl acetic acid او مشتقاته الهيدروكسيلية (Rush واخرون, 1965). ان ظهور اعراض مرض تعفن الجذور نباتات البطيخ نتجت عن مهاجمة الخيوط الفطرية للفطر *R. solani* للنسيج وامتداد الخيوط الفطرية بين الخلايا مسببة تلون الأنسجة بلون بني, وقد تحدث هذه الأعراض قبل وصول الفطر للأنسجة وذلك لان الفطريات تقوم بأفراز مواد سامة وانزيمات محللة للسيليلوز واللكنين مما يؤدي الى تفكك الخلايا وهذا يؤدي الى تحليل الجذور وتعفنها وقله امتصاص المواد الغذائية ومن ثم حدوث ضرر في نمو النبات (Hall,1991 و Sett واخرون،2000).

الجدول 8. النسبة المئوية لأنبات بذور البطيخ تحت ظروف الظلة الخشبية

العزلات المختبرة للفطر(*R. solani*)	نسبة الانبات (%)
RS-1	20.00
RS-3	33.33

RS-6	0.00
RS-9	53.33
المقارنة	100
قيمة LSD* (P<0.05).	9.762 *

العدد بجانب الرمز يمثل رقم العزلة R.s = *R. solani*

الجدول 9.النسبة المئوية لشدة اصابة بذور البطيخ وبادراتها بمرض تعفن جذور البطيخ تحت ظروف الظلة الخشبية

العزلات المختبرة للفطر (*R. solani*)	شدة الإصابة(%)
RS-1	100
RS-3	77.33
RS-6	100
RS-9	88.00
المقارنة	0.00
قيمة LSD* (P<0.05).	9.694 *

العدد بجانب الرمز يمثل رقم العزله R.s = *R. solani*

وان هذه النتائج تتفق مع ماتوصل الية Stepniewska_Jarosz(2012) ان الفطر الممرض *R. solani* يصيب نبات البطيخ تحت الظروف الرطوبة العالية وكثافة النباتات الكبيرة وخاصة في الزراعة تحت البيوت المحمية ويسبب تعفن جذور قواعد وسيقان البطيخ وايضا خفضا معنويا في نسبة انبات بذور البطيخ وزيادة في شدة الأصابة.

اختبار المقدرة التضادية للبكتريا *B.subtilis* ضد الفطر الممرض *R.solani* على الوسط الزرعي P.D.A .

اظهرت النتائج (جدول 10) ان البكتريا *B. subtilis* المختبرة احدثت تأثيرا معنويا في تثبيط نمو عزلات الفطر الممرض المسببة لمرض تعفن الجذور لنبات البطيخ مقارنة مع معاملة المقارنة (الفطر الممرض بمفرده) دون اضافة عالق البكتريا اذ وصلت النسبة المئوية لتثبيط عزلات الفطر الممرض *R. solani* (R.S-9, R.S-6, R.S1) (81.37 , 85.92 , 72.96%) على التوالي وقد يرجع التأثير التثبيطي للبكتريا *B. subtilis* الى أن ألية تأثيرها في المقاومة الأحيائية للفطريات المسببة لأمراض النبات يكون عن طريق انتاج المضادات الحيوية التي تفرز خارج خلاياها وهيدروكاربونات متطايرة وهي المسؤولة عن تثبيط نمو المسببات المرضية, ومن المعروف ان البكتريا *B. subtilis* تنتج اكثر من 66 نوع المضادات الحيوية معظمها ببتيدات ومن هذه المضادات subsporin ، neocidin ، eumycin ، bacillomycin ، subtilin وmycosubtilin وbacilysin وغيرها (Hanafi واخرون،2007 و Akhtar وأخرون, 2010 و Sorokulova, 2013).

الجدول 10. تأثير الفعالية التضادية لبكتريا *B. subtilis* ضد الفطرالممرض *Rhizoctonia solani* على الوسط الزرعي PDA

المعاملة	معدل النمو للفطر (سم)	نسبة التثبيط (%)
R.S-1 + بكتريا B.s	1.67	81.37
R.S-9 + بكتريا B.s	2.43	72.96
R.S-6 + بكتريا B.s	1.27	85.92
المقارنة (الفطر بمفرده)	9.00	0.00
قيمة LSD* (P<0.05).	0.431 *	4.739 *

العدد بجانب الرمز يمثل رقم العزلة R.s-6 = *Rhizoctonia solani*, B.s= *B. subtilis*

ذكر Alabouvette واخرون (2006) ان من أليات البكتريا *Bacillus* spp. في السيطرة على المسببات المرضية هو تنافسها مع الفطريات على مصادر الكاربون الذي هو احد عوامل تكوين وانبات الأبواغ ومن ثم تؤثر في نمو الفطر.وجاءت النتائج متفقة مع نتائج الاختبار التي قام بها العيداني (2010) أن بكتريا *B.subtilis* ذات كفاءة تضادية عالية ضد الفطر *R. solani* في الوسط ألزرعي PDA ، أذ سببت البكتريا تثبيطا تاماً للفطر بلغ 100%.

أختبار المقدرة التضادية للفطر الأحيائي *Trichoderma harzianum*ضد الفطر الممرض *Rhizoctonia solani*على الوسط الزرعي PDA.

بينت النتائج (جدول11) وجود مقدرة تضادية عالية بين عامل المكافحة الاحيائية *T. harzianum*ضد عزلات الفطر المرض المختبرة *R. solani* R.s-1, R.s-6 , R.s-3 اذ حقق الفطر*T. harzianum* مقدرة تضادية عالية بلغت الدرجة 1 و2 حسب السلم الذي وضعه Bell واخرون (1982) في جميع العزلات

وذلك بعد سبعة ايام من تلقيح الوسط الزرعي. وهذا يتفق مع ماحصل عليه عدد من الباحثين الذين اشاروا الى طبيعة تضاد مماثلة بين عامل المكافحة الاحيائية *T. harzianum* والفطريات الممرضة للنبات مثل الفطر الممرض *R. solani* (Haran واخرون،1996 و Harman، 2000). وقد يعود السبب في المقدرة التضادية العالية للفطر *T.harzianum* الى التطفل المباشر للفطر *T. harzianum* على الغزل الفطري للفطر الممرض والتفافه حوله وتحليل جدران الخلايا من خلال انزيمات Chitinase او 1, 3 -ß gluconase والتضاد الحيوي والمنافسة على المكان والمواد الغذائية (Hasan واخرون، 2014 و Nawrocka واخرون،2017).

الجدول 11. المقدرة التضادية للفطر الاحيائي *T. harzianum* ضد الفطر الممرض *Rhizoctonia solani*

العزلات المختبرة للفطر(*R. solani*)	قطر المستعمرة (ملم)	نسبة التثبيط (%)
T.h + RS-1	0.626	93.03
T.h + RS-6	0.570	93.66
T.h +RS-3	1.86	78.99
المقارنة (الفطر بمفرده –R.S)	0.00	0.00
قيمة LSD* (P<0.05).	0.290	3.186

العدد بجانب الرمز يمثل رقم العزلة, T.h=*Trichoderma harzianum* ,R.S= *Rhizoctonia solani*

تأثير عوامل المكافحة الأحيائية والمبيد الكيميائي Beltanol في نسبة وشدة الأصابة بمرض تعفن جذور البطيخ وبعض معايير النمو تحت ظروف الظلة الخشبية:-

اظهرت النتائج (الجدول12) ان جميع المعاملات التي استخدمت فيها عوامل المكافحة الحيوية ادت الى خفض النسبة المئوية للاصابة وشدة الاصابه بمرض تعفن الجذور على نبات البطيخ, وبتفوق معنوي لمعاملة التكامل بين الفطر الأحيائي *T.harzianum* والبكتريا *B.subtilis* وحامض السالسليك Salicylic acid بوجود الفطر الممرض*R.solani* خفضاً في نسبة وشدة الاصابة حيث بلغت نسبة الأصابة 11.1 وشدة الأصابة 2.22 وهي بذلك حققت نتائج افضل من معاملة المبيد الكيميائي Beltanol حيث بلغت نسبة ألأصابة 44.4 وشدة الأصابة8.88%, يعود سبب تفوق معاملات التداخل ما بين العوامل الأحيائية فيما بينها في خفض النسبة المئوية لشدة الإصابة وزيادة معايير النمو إلى أن التداخل ما بين عوامل المقاومة الأحيائية يحقق نتائج أفضل وذلك لأن كل مقاوم إحيائي له أليات مختلفة في مكافحة المسبب المرضي وباجتماع هذه الأليات سيكون هناك كبح اكبر لتأثير المسبب المرضي وستكون النتائج أفضل فيما لو استعمل المقاوم الأحيائي بصورة منفرده ومن هذه الآليات التحفيز على إنتاج منظمات النمو والتي تلعب دور مهم في عملية نمو النبات(Xu وJeger, 2013).أن التداخل ما بين عوامل المقاومة الإحيائية يكون أكثر تأثيراً في خفض شدة الأصابة بمسببات امراض النبات مقارنة فيما لو استعمل عامل إحيائي بصورة منفرده وتأثيرها في رفع معايير النمو للنبات بشكل كبير على عوائل نباتية مختلفة (سلمان,2014).

أن للفطر*T . harzianum* تأثير سلبي على نمو الفطر الممرض *R. solani* حيث أدى إلى تثبيط نمو الغزل الفطري بسبب وجود ابواغ الفطر الملامسة لسطح البذرة ونموها واستقرارها في التربة المحيطة بالبذور، حيث يقوم بإفراز بعض المركبات الكيميائية التي لها تأثير مثبط للفطر الممرض، أو من خلال التفاف الخيوط الفطرية لفطر المقاومة الاحيائية حول الخيوط الفطرية للممرض. ومن ثم تحليل جدرانه بواسطة الإنزيمات التي يعتقد أنها تلعب دوراً مهماً في تثبيط نمو الغزل الفطري للمرض مما يعيق حدوث عملية الإصابة (Moussa، 2002 و Saba وآخرون, 2012). وتتفق النتائج مع ما ذكره Barakat وآخرون (2007)من أن معاملة البذور بعالق الفطر*T . harzianum* قد أدى إلى تخفيض نسبة الإصابة بمرض تعفن الجذور المتسبب عن فطر *R. solani*على الفاصوليا بنسبة 65%. وخفضت معاملة البكتريا *B.subtilis* نسبة الاصابة بالفطر الممرض *R.solani* الى إصابة44.4% وشدة إصابة 8.88 %. تتمكن البكتريا *B.subtilis* من تحليل الخيوط الفطرية من خلال افراز العديد من الأنزيمات المحللة مثل إنزيم Protease و Lipase و Amylase و Chitinase والتي تقوم بتحليل مادة الكايتين التي هي المكون الرئيس لجدران خلايا معظم الفطريات و أن للبكتريا *B.subtilis* دورا فعالا في منطقة الـ Rhizosphere فهي تعمل على تثبيط المسببات المرضية ومنافستها على المواد الغذائية كذلك تقوم باستحثاث المقاومة الجهازية للنبات علاوة على قدرتها على انتاج مركبات Siderophore ومن ثم تفرز عنصر الحديد الضروري لنمو النبات وكذلك انتاجها للمضادات الحيوية والانزيمات المثبطة لنمو الفطريات الاخرى وتزيد من جاهزية بعض العناصر المعدنية التي يحتاجها النبات لنموه مثل النتروجين (Morikawa، 2006). كما بين الجدول ان العوامل الحيوية المضافة

الى النبات مفردة او متداخلة مع بعضها وفرت حماية للنبات و حسنت معايير النمو معنوياً قياساً بمعاملة الفطر الممرض. كما أظهرت النتائج (جدول 12) ان جميع المعاملات المستخدمة لمكافحة مسبب مرض تعفن جذور البطيخ حققت زيادة معنوية في مؤشرات النمو متمثلة في الوزن الطري والجاف وطول المجموع الجذري وطول المجموع الخضري قياساً بمعاملة الفطر الممرض بمفرده التي ادت الى خفض معنوي للوزن الطري والجاف وطول المجموع الجذري والخضري ,حيث تفوقت معاملة الفطر الأحيائي بمفرده *T.harzianum* بلغ طول المجموع الخضري والجذري والوزن الطري والجاف 57.85 , 14.03 سم, 407.52 , 66.77غم على التوالي تليها معاملة التكامل بين الفطر الاحيائي *T. harzianum* والبكتريا *B.sutillus* وحامض السالسليك Salicylic acid بوجود الفطر الممرض *R. solani* بلغ طول المجموع الخضري والمجموع الجذري والوزن الطري والوزن الجاف 74.58 , 10.69سم, 378.58 , 50.86غم على التوالي. وعلاوة على ذلك حققت بقية معاملات التداخل ما بين العوامل الأحيائية وبوجود الفطريات الممرضة زيادة معنوية وبفروق معنوية في جميع معايير النمو مقارنة مع معاملة الفطر الممرض بمفرده. كما ادى استخدام حامض السالسليك بتركيز 100 مغلم/لتر الى خفض نسبة وشدة الاصابة بمرض تعفن الجذور لنبات البطيخ. وأن هذه النتائج جاءت مؤكدة لنتائج دراسة قام بها Kataria واخرون (1997) إذ أستخدم محاليل كيميائية مثل D- Acetyl salicylic acid و 5- nitro salicylic acid بأعتبارها مواد محفزة للمقاومة المستحثة في النبات إذ اظهرت كفاءة في تثبيط الفطر *R.solani* على الوسط الزرعيPDA عند أستخدامها بتراكيز (2.5و5 و10 مليلتر) يعود سبب فعالية حامض السالسليك الى مادة الاسبرين الفعالة والتي تؤثر في عمل الانزيمات والاحماض الامينية وبالتالي تثبط العديد من العمليات الحيوية المهمة مما يؤثر في نشاط ونمو المسببات المرضية (popova وآخرون ،1997 و Uquillasوآخرون ،2004) أن آلية عمل حامض السالسليك في السيطرة على المسببات المرضية يمكن أن تلخص بأن حامض السالسليك يعمل على تحفيز المقاومة الجهازية من خلال تحفيز الجينات المشفرة لبعض البروتينات ذات العلاقة بالامراضية مثل انزيمات Chitinases و B-1,3 glucanase(Chen وآخرون ، 1993).

الجدول 12. تأثير عوامل المكافحة الاحيائية في نسبة وشدة الاصابة بمرض تعفن جذور البطيخ وبعض معايير نموالنبات تحت ظروف الظلة الخشبية

المعاملة	نسبة الاصابة (%)	شدة الاصابة (%)	طول النبات/سم		وزن النبات/غم	
			الخضري	الجذري	الطري	الجاف
R.S-6 بمفرده	100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T.h + R.S-6	44.4	15.55	66.10	8.47	246.96	42.24
B.S + R.S-6	44.4	8.88	54.22	6.62	169.76	41.84
Sa + R.S-6	55.5	20.00	51.58	5.79	154.59	32.39
B.S + T.h + R.S-6	44.4	8.88	70.55	7.51	300.11	46.36
Sa + T.h + R.S-6	44.4	8.88	70.05	7.01	259.25	44.17
Sa + B.S + R.S-6	44.4	8.88	64.40	6.85	200.00	43.58
Sa + B.S + T.h + R.S-6	22.2	4.44	74.58	10.69	378.58	50.86
Bel + R.S-6	11.1	2.22	51.06	10.51	216.48	50.51
المقارنة (Cont.)	0.00	0.00	41.64	6.21	110.52	40.47
T.h بمفرده	0.00	0.00	57.85	14.03	407.52	66.77
B.S بمفردها	0.00	0.00	53.62	13.81	303.51	65.11
Sa بمفرده	0.00	0.00	52.00	13.10	375.76	62.37
B.S + T.h	0.00	0.00	72.18	17.07	507.37	75.14
Sa + T.h	0.00	0.00	70.48	15.77	477.99	74.07
Sa + B.S	0.00	0.00	70.21	14.99	495.00	71.58
Sa + B.S + T.h	0.00	0.00	76.89	19.10	604.17	80.79
LSD (P<0.05).	8.291	5.315	.085 7	.117 3	3.927 3	.306 5

R.s=*Rhizoctonia solani* العدد بجانب الرمز يمثل رقم العزلة، T.h=*Trichoderma harazianum*, Sa=Salicylic acid , B.s =*Bacillus subtillus*.

المصادر

المصادر العربية

العيداني، ماهر عبد الوهاب ناهي (2010). التكامل في تأثير بعض العوامل الإحيائية والكيميائية في مكافحة مرض سقوط بادرات الطماطا المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* Kuhn. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة البصرة: 32 صفحة.

المنظمة العربية للتنمية الزراعية (2013). الكتاب السنوي للإحصاءات الزراعية. 27، 422 صفحة.

سلمان، فواد عباس (2014). تأثير اضافة السماد الحيوي *Azotobacter* spp. والنتروجيني على نمو شتلات نباتي الطماطة *Lycopersicon esculentum* Mill. والباذنجان*Solanum melongena L.* المزروعان تحت ظروف الزراعه المحمية. مجلة الفرات للعلوم الزراعيه، 6 (3): 36-54.

المصادر الانكليزية

Akhtar, M. S.; Shakeel, U. and Siddiqui, Z. A. (2010). Biocontrol of fusarium wilt by *Bacillus pumilus, Pseudomonas alcaligenes and Rhizobium* spp. On lentil. Tur. J. Biol., 34, 1-7.

Alabouvette, C.; Olivain, C. and Steinberg, C. (2006). Biological control of plant diseases: the European situation. European J. Plant Pathology., 114: 329-341.

Anne, E. D.; Patrick, E. L. and Dennis, R. M. (2002). *Rhizoctonia* damping-off and stem rot of Soybean Ohio state university extension pact sheet plant Pathology.

Ardakani, M. R.; Mazaheri, D.; Rad, A. H. S. and Mafakheri, S. (2011). Uptake of Micronu-trients by Wheat (*Triticum aestivum* L.) in a Sustainable Agroecosystem. Middle East J. Sci. Res., 7 (4): 444-451.

Barakat, R. M., F. AL-Mahareeq, M. S. Ali .)2007(shtayeh and M. I. Al-Masri. Biological control of *Rhizoctonia solani* by indl genous *Trichoderma* spp. Isolates from Palestin. Hebron University Rese. J. 3(1): 1-15.

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

Bolkan, H. H. and Butler, E. E. (1974). Studies on heterokaryosis virulence of *Rhizoctoniasolani*. Phytopathology, 64: 513–522.

Chen, Z., H. Silva, and D. F. Klessing . 1993 . Active Oxygen species in the induction of Plant systemic acquired resistance by Salicylic acid. Science. 262: 1883 – 1885.

Constantinescu, F.; Alina, S. O. and Petruta, C. (2015). Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. Romanian Biotechnological Letters, 20 (5).

Dewan, M. M. (1989). Identify and frequency of occurence of fungi in roots of wheat and rye grass and their effect on all and host growth. Ph. D. Thesis -take Univ. Wes. Australia., 210 pp.

Fatima, Z.; Saleemi, M.; Zia, M.; Sultan, T.; Aslam, M.; Rehman, R. U. and Chaudhary, M. F. (2009). Antifungal activity of plant growth- promoting rhizobacteria isolates against *Rhizoctoniasolani* in wheat. African J. O.

Hall, R. (1991). Compendium of bean diseases. American phytopathol., Soc., St. paul., MN. 74 pp.

Hanafi, A.; Traore, M.; Wilfried, H. and Woitke, M. (2007). Induced resistance of tomato to whiteflies and *pythium* with the PGPR *Bacillus subtillis* in a soilless crop grown under green house conditions Weihenstephan; Techn. Univ. Munich, Germany.

Haran, S.; Schickler, H. and Chet, I. (1996). Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology, 142: 2321-2331

Harman, G. E. (2000). Myths and Dogmas of biocontrol change in perceptions derived from reseaech on *Trichoderma*

Morikawa, M. (2006). Benefical Biofilm formation by industrial *Bacillus subtilis* and related species Bio- Sci. Bioengineering., 101 (1): 1-8.

Moussa, T. A. A. (2002).Studies on Biological control of sugar beet pathogen *Rhizoctonia solani* Kühn .online Journal of Biological Sciences 2(12) 800 – 804.

Nawrocka, J.; Szczech, M. and Malolepsza, U.(2017). *Trichoderma atroviride* enhances phenolic synthesis and cucumber protection agaist *Rhizoctonia solani.* Plant protect. Sci.,53.

Nehal,S. El-mougy,M.M. Abdel-kader,S.M. Lashin.(2014).Fungicide Alternatives for controlling Cantaloupe Root Rot Incidence under plastic House conditions.(IJEIT).3(9):2277-3754.

Parmeter, J. R. and Whitney, H. S. (1970). Taxonomy and nomencleature of the iM. pherfect stage In: *Rhizoctonia solani* Biology and Pathology. Parmeter, J. R. Univ. of California., 7–19.

Popova, L. ; T. Pancheva and A. Uzunova .1997. Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role . Blug. J. Plant Physiol . 23: 85-93.

Rush, M. and Jeffer.s, W.F.(1965). Effect of some soil factor on efficiency of fungicide in controlling *R.solani* phytopathology. 55: 88-90.

Saba, H.; Vibhash, D.; Manisha, M.; Prashant, K. S.; Farhan, H. and Tauseef, A. (2012). *Trichoderma* a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. Mycosphere, 3(4), 524–531, Doi 10.5943/mycosphere/3/4/14.

Saitoh, K.; Togashi, K.; Arie, T. and Teraoka, T. (2006). A siM.phlemethod for a mini preparation of fungal DNA. J. General Plant Pathology,72: 348–350.

Sallam,A.N., Riad,S.N., Mohamed,M.S. and El-eslam,A.S.2013.Formulation of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas flourescens* for biocontrol of cantaloupe *harzianum* strain T-22. Plant Disease, 84: 377-393.

Hasan, S.; Gupta, G. S. Anand, H. and Kaur, H. (2014). Lytic Enzymes of *Trichoderma*: Their Role in Plant Defense. International J. Appl. Res. and Studies (iJARS). ISSN: 2278-9480, 3 (2):1-5.

Helmy, M. M., Gado E., El-Deeb S., Mostafa H. M.. (2015). Phenotypic DiveR.sity 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.

Hsiang, T. and Dean, J.D. (2001). DNA sequencing for anastomosis grouping of Rhizoctonia solani isolates from Poa annua.International Turfgrass Society Research Journal V9:674-678.

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

Kataria, H. R.; Wilmsmeier, B. and Buchenauer (1997). Efficacy of resistance inducers freeradical scavengers and an antagonistic strain of Pseudomonas fluorescens for control of Rhizoctonia solani AG-4 in bean and cucamber. Plant Pathology, 46(6): 897-909.

Lucas, G. B.; Campbell, C. L. and Lucas, L. T. (1985). Introduction to plant disease, identification and management. The AVI Publishing Company, Inc. USA., 313 pp.

Mckinney, H.H.(1923).Biological control of nematode pests by natural enemies. Ann. Rev. Pytopathol. 18:415-440.

Mohamed, M. H.; Gado, E. A. M.; El-Deeb S. H. and Mostafa, M. H. (2014). Behavior of fungus *Rhizoctoniasolani* under faba bean cotyledons when away from host and the effect of it starvation on aggressiveness. J. Yeast and Fungal Rese., 5 (1): 1-8.

root rot caused by *Fusarium solani* .Jour.of plant prot.Res.53(3):295-300.

Sambrook, J. D. (2001). Molecular cloning. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harber.

Santos, L.; Candido, W.; Rabelo, H.; Marin, M.; Gaion, L.; Gomesm, R.; Camargo, M. and Braz, L. (2017). Reaction of melon genotypes to didymella bryoniae (Fuckle) Reham. J. Hileam,

Sett, S.; Mishra, S. K. and Siddiqui, K. A. I. (2000). Avirulent mutants of *Macrophomina phaseolina* and *Aspergillus fumigatus* initiate infection in *Phaseolus mungo* in the presence of phaseolinone; Levamisole gives protection. J. Biosci., 25(1):73-80.

Shoaei, S. h.; Noor-mohammadi, G. h.; Choukan, R.; Kashani, A.; Heydari, S. h. H. and Rafiei, F. (2012). Study of Nutrient Accumulation In The Aerial And Forage Yield Affected By Using Of Nitroxin, Supernitro Plus And Biophosphor In Order To Reduce Consumption Of Chemical Fertilizers And Drought-Resistant In Corn (KSC-704). Advances in Environmental Biology, 6 (1): 125-131.

Simson, R.; Tartlan, L.; Loit, E. and Eremeev,V. (2017). The effect of different pre-crops on *Rhizoctonia solani* complex in potato. Agronomy Research, 15(3): 877-885.

- Sneh, B., S. Jabaji- Hare, S. Neate and G. Dijst. 1996. *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer Academic Publishers, London. 578pp.

Stepniewska_Jarosz.,(2012). *Rhizoctoina solani*J.G.Kuhn. in: M.Rataj Guranowska,A.Pieczul(ed.),Kompendium symptomow chorob roslin I morfologii sprawcow. IOR-PIB BPR Bogucki Wyd. Nauk., Poznan, 158-163.

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.

Su, G.; Suh, S. O.; Schnieder, R. W. and Russin, J. S. (2001). Host Specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*, Phytopathology.,91: 120–126.

Uquillas, C.; I. Letelier ; F. Blanco ; X. Jordana and L. Holuigue . 2004. NPR1-Independent activation of immediate early salicylic acid responsive genus. Societ. 17(1):34-4.

Xu, X. M. and Jeger, M. J. (2013). Combined Use of Two Biocontrol Agentswith Different Biocontrol Mechanisms Most Likely Results in Less Than Expected Efficacy in Controlling Foliar Pathogens Under Fluctuating Conditions: A Modeling Study. Phyto., 103 (2): 108-116.

Yang, B., G. Yonghong ; W. chunling : L. Xuewen. (2007). Melon production in China. Acta Hort. (ISHS) 731 : 493 – 500 .