**The Effect of Some Ecological Factors on the Groth of *Sclerotinia sclerotiorum* and It's Producting of Sclerotia**

**تأثير بعض العوامل البيئية في نموالفطر *Sclerotinia sclerotiorum* وانتاجه للاجسام الحجرية**

حيدر عبد المنعم المظفر\* بان طه محمد

قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

مستل من رسالة ماجستير

|  |
| --- |
| **المستخلص :-**  اجريت سلسلة من التجارب المختبرية في مختبر الدراسات العليا ، ـقسم علوم الحياة بكلية التربية للعلوم الصرفة بجامعة كربلاء للمدة من كانون الثاني 2011لغاية كانون الثاني 2013، تم من خلالها دراسة تأثيرعدد من العوامل البيئية كدرجة الحرارة , الرقم الهيدروجيني ونوع الوسط الغذائي, لمعرفة مدى تأثيرها في نمو الفطر*Sclerotinia sclerotiorum*, وانتاجه للاجسام الحجرية ، ومدى تأثير تلك العوامل في حيوية الاجسام الحجرية المنتجة من خلفة الفطريات المعرضة للعوامل والتي تمثل الجيل الاول ، واظهرت النتائج ، إن درجات الحرارة 10-20˚م ورقم الهيدروجيني الحامضي 3.5- 6.5 ،هي الافضل لنمو الفطر و انتاج الاجسام الحجرية, فيما كان الوسط اكار دكستروز البطاطا PDA)) هو الافضل لنمو الفطر وانتاجه للاجسام الحجرية مقارنة بالاوساط الاخرى المستعملة وهي وسط المانيتول اكار MA , وسط الزابك دوكس اكار CDA و وسط الاكار المغذي NA. وعند زراعة الاجسام الحجرية الناتجة من خلفة الاجسام الحجرية المعاملة ادت الى نمو كامل فضلا عن انتاج اجسام حجرية طبيعية لم تختلف عن المقارنة .  **Abstract:**  Series of experiments were conducted at Biology Department – College of Education fore Pure Science , Kerbala University during the period from Jan. 2012 till Jan.2013. this The aim of this study to assess of some Ecological factors including temperature , pH and the growth media on the growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and its ability in sclerotia production . Results revealed that , temperature ranged from 10-20 0C and the pH ranged from 3.5-6.5 were the best factors for fungal growth and sclerotia production . Potato dextrose agar (PDA) was the best as compared with others including Mannitol agar MA, Czapeks dox agar CDA and Nutrient agar NA .Sclerotia produced from treated sclerotia showed normal growth and produced normal sclerotia which did not differe from the control. |

**المقدمة:**

يعد الفطر *S.sclerotiorum* من الفطريات ذات المدى الواسع في اصابة المحاصيل النباتية و في مختلف انحاء العالم ( Matheron و Porchas ، 2005 )، وينمو بدرجات حرارية تتراوح بين 10- 20°م ٬ و تمثل الدرجة الحرارية المفضلة للنمو و احداث الاصابة وكذلك تخليق الاجسام الحجرية (Mila و Yang ، 2007). وبين Lanoiselet وجماعته، (2005)، ان الاجسام الحجرية للفطر *S.sclerotiorum* تمتلك القدرة على تحمل مديات حرارية عالية تصل الى 121 م°، و ان هذه الاجسام لها القدرة على الانبات والتجديد من خلال تكوين الغزل الفطري mycelium او من خلال تكوين الجسم الثمري Apothecium بشكل طبيعي عند انخفاض درجة الحرارة وعودة الظروف الى الحالة الطبيعية مرة اخرى. اماMohammed ،(2001) ، فبينت ان ارتفاع حرارة التربة الى 60 م° بوجود اليوريا يؤدي الى انتاج اجسام حجرية مشوهة و غير قادرة على الانبات و التجديد . وتعتبر درجات الحرارة التي تتراوح بين 4-8 م° هي المناسبة لانتاج الاجسام الثمرية والابواغ الكيسية Acsospores (Mohammed ،2001 و Mila و Yang ، 2007 (. وتنبت الابواغ الكيسية في مدى يتراوح بين 4-25 م° و يمكن ان تصل ايضا الى اقل من 4 م° Partridge) وجماعته ، 2006 ).

اوضحت بعض الدراسات، بأن الفطر له القدرة على النمو و انتاج الاجسام الحجرية ضمن مدى واسع من pH Mohammed) ،2001 ) ، وبين كل من Agnihotri و Rai ، (1971) ، ان الفطر له القدرة على النمو و انتاج اجسام حجرية قادرة على التجديد ضمن مديات مختلفة تتراوح بين3.5 - 9.0 و يعتبر المدى الحامضي 4.1- 5.5 هو المدى الافضل لنمو الفطر وانتاج الاجسام الحجرية. واوضح Rollins و Dickman، (2001)، في دراستهما ان الوسط الحامضي له علاقة في ضراوة الفطر من خلال دور حامض الاوكزاليكoxalic acid

الذي يوفر بيئة ملائمة لعمل الانزيمات الضرورية لامراضية الفطر على النبات. ويمكن الاشارة الى دور بعض الاملاح اللاعضوية الموجودة في التربة في تثبيط تكوين الاجسام الحجرية لما لها من تأثير في الجهد الازموزي و

الكهربائية في التربة والتي تعتبرمن العوامل التي تؤثر في حيوية الفطر من جهة و في العمليات الحيوية للنبات من جهة اخرى فقد تزيد او تقلل من قدرة النبات على المقاومة ( Hassan و Shahzad ، (2004.

ويعد الوسط الغذائي عاملا هاما في التأثير في نمو الفطريات ونشاطها، و توجد عدة انواع مستعملة في تنمية و تشخيص الفطريات، وتظهر بعض الفطريات تغايرا واضحا في الخواص المظهرية من وسط الى وسط اخر، وتأتي اهمية دراسة الوسط الغذائي في معرفة متطلبات النمو الخاصة بالفطر وكذلك في فهم العلاقة بين الفطر المتطفل و العائل الذي ينمو عليه( Tanrikutو Vaughan ، 1951) . فمن خلال دراسة اجراها كل من Agnihotri وRai (1971) على الفطر*S. sclerotiorum* وعلى عدد من الاوساط المختلفة و منها وسط بطاطا دكستروز اكار PDA و وسط ريتشارد Richard's Mediumو وسط براون Media Brown's وجدا ان هنالك اختلافا واضحا في معدل نمو الغزل الفطري وكذلك انتاج الاجسام الحجرية حيث كان معدل النمو على الاوساط المذكورة هو 9.0 , 7.5 و 5.2 سم على التوالي كذلك وجد هناك اختلاف في عدد الاجسام المنتجة على كل وسط و الذي بلغ 18, 25 و 12 هذا فضلا عن الاختلاف في حجم الاجسام نفسها . اما Wang و Le tuorneau ، (1971) فدرسا تأثير انواع مختلفة من مصادر الكاربون وعند تراكيز مختلفة في الوسط الغذائي في نمو الفطر ومعدل تخليق الاجسام الحجرية ، ووجدا ان نمو الغزل الفطري يصل الى اعلى معدل له عند استخدام D - Glucose و D-Mannose فيما ينخفض تدريجيا ويصل الى اقل مستوياته عند استخدام سكري L-Sorbose و L-Xylose. وقد اوضح Mohamed ، (2001) ، في دراسته لعدد من العوامل المؤثرة في نمو الفطر *S. sclerotiorum* ،ان الاوساط الزرعية كان لها تأثيرا واضحا في نمو اربع سلالات مختلفة (S1، S2،S3و ( S4 ،حيث بين ان الوسط PDA هو الوسط الافضل لنمو جميع العزلات المدروسة متفوقا بذلك على وسط الخميرة دكستروز اكارYeast Dextrose Agar (YDA) ووسط الاكار المغذي(NA) Nutrient Agar، فيما كان الوسط (PA) Patato Agar هو الاقل تفضيلا ولم تظهر العزلات المدروسة أي استجابة في النمو على الوسط(GFM) Gliotoxin Fermentation Media .وبهذا فان الدراسة هدفت الى دراسة تأثيرعدد من العوامل البيئية كدرجة الحرارة,الرقم الهيدروجيني ونوع الوسط الغذائي,لمعرفة مدى تأثيرها في نمو الفطر*Sclerotinia sclerotiorum*,وانتاجه للاجسام الحجرية،ومدى تأثيرتلك العوامل في حيويةالاجسام الحجرية المنتجة من خلفة الفطريات المعرضة للعوامل والتي تمثل الجيل الاول.

**المواد و طرائق العمل:**

تم عزل وتنقية الفطر *S. sclerotirum* من نباتات الباذنجان المصابة بالفطر من مناطق مختلفة شملت البيوت الزجاجية في كلية الزراعة في ابي غريب ببغداد والمناطق المجاورة لها وكذلك من البيوت الزجاجية التابعة لقضاء المسيب في بابل والمناطق المجاورة لها في كانون الثاني من عام 2012 ،وبعد عزلها وتشخيصها مختبريا وفقا لما أورده 1979 )، Kohn) و Tariq واخرون،( 1985) وSaharan و Mehta ، 2008)). وجد انها تعود الى نفس النوع ، وفي دراسة سابقة لنفس الباحثين وجد بانها تعود للسلالة (MCG) وعند التتابع 475 bp و للمنطقة المعروفة باسم Entrobacterial Repetitive Intergenic (ERIC باستعمال تقانة الـ PCR . تم اكثار الفطر على وسط الحنطة كما جاء في Mohammed ، (2011) لغرض انتاج الاجسام الحجرية و الاحتفاظ بها لحين اجراء التجارب. وقبل زراعة الاجسام الحجرية ، يتم غسلها بالماء العادي ،ومن ثم تعقيمها سطحيا بغمرهـــــــا مدة ثلاث دقائق بمحلول الكلوراكس التجـــــــــاري 0.06% ، ومن ثم غسلها عدة مرات بالماء المقطر المعقم ، وتجفف على أوراق ترشيح معقمة.

حضر الوسط بطاطا دكستروز اكار PDA)) حســب طريقة Steven ، ( 1981) ،واضيف إليه المضاد الحيوي الكلورومفينيكول (Chloramphenicol) بمعدل 250 ملغم / لتر.عقم بدرجة حرارة 121 oم وتحت ضغط 15بار .وتم صبه في اطباق بتري وكما يلي:-

1- لدراسة تأثير درجات الحرارة : بعد تصلب الوسط، تم زراعة وسط الطبق بقرص قطره 5 ملم من مزرعة الفطر *S. Sclerotiorum* النامي على وسط PDA و بعمر 5 أيام، حضنت الاطباق بخمس مستويات من درجات الحرارة 10 , 15 , 20 , 25 و 30˚م ٬ واربعة مكررات لكل مستوى ، حضنت الأطباق جميعها لمدة 12 يوما ، تم من خلالها متابعة النمو الخضري للفطر وتكوينه للاجسام الحجرية وبذلك سجلت مدد حضن وفقا لتطورات النمو و نشوء وتكوين الاجسام الحجرية وهي 5، 7،10 و12 يوما.و تم قياس قطر المستعمرة النامية ( معدل قطرين متعامدين ) وحسب معدل النمو وكذلك معدل تخليق الاجسام الحجرية .

2- لدراسة تأثير الرقم الهيدروجيني: تم اضافة بضع قطرات من القاعدة NaOH بتركيز 10عياري او بضع قطرات من HCl بتركيز 10عياري الى الوسط الزرعي مع مراعاة تعقيم المحاليل باستخدام Millipore filter 0.22 للحصول على مستويات من الـ pH 3.5،4.5، 5.5 ،6.5 ،7.5 ،8.5 و 9.5وتحت ظروف معقمة وباستعمال pH meter ( Agnihotrو Rai ، 1971 )، تم التلقيح كما في اعلاه ،وبواقع اربعة مكررات لكل معاملة ،وحضنت لمدة 12 يوما بدرجة حرارة 18 ± 2 °م. و تم قياس قطر المستعمرة النامية ( معدل قطرين متعامدين ) وحسب معدل النمو وكذلك معدل تخليق الاجسام الحجرية .

3– لدراسة تأثير الاختلاف في نوع الوسط الغذائي: اعتمدت عدة انواع من الاوساط الغذائية و هي وسط اكار دكستروز البطاطا Potato Dextrose Agar، وسط الزابك اكار Czapeks Dox Agar , وسط المانيتول اكار Agar Mannitol, و وسط الاكار المغذي (Nutrient agar (NA ، تم التلقيح كما في اعلاه ، حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة 18±2°م و لمدة 12 يوما (Ragab واخرون ، 1997). و تم قياس قطر المستعمرة النامية ( معدل قطرين متعامدين ) وحسب معدل النمو وكذلك معدل تخليق الاجسام الحجرية .

4- تم زراعة الاجسام الحجرية الناتجة من خلفة الاجسام الحجرية المعاملة والتي تمثل الجيل الاول على وسط الـ PDA وحضنت لمدة 12 يوما بدرجة حرارة 18 ± 2 °م. و تم قياس قطر المستعمرة النامية ( معدل قطرين متعامدين ) وحسب معدل النمو وكذلك معدل تخليق الاجسام الحجرية .

**النتائج:**

بينت النتائج في الجدول (1) ، ان مدة الحضن 5 يوم سجلت اقل معدل لنمو الفطر و بواقع 6.0 سم واختلفت معنوياً عن مدة الحضن 7 و 10 يوم التي سجلت 6.3 و 6.4 سم على التوالي ، فيما لم تختلف مدتي الحضن 7 و 10 فيما بينهما. و يتضح من نفس الجدول ان هناك فروقات معنوية في معدل درجات حرارة حضن المستعمرات الفطرية , و سجلت درجات الحرارة 35˚م اقل معدل نمو قطري للمستعمرة و بواقع 0.5 سم و التي اختلفت معنوياً عن كل من 25 و 30˚م , في حين لم تؤثر درجات الحرارة 10 , 15 و 20ºم في معدل قطر المستعمرة . كما و ان هنالك تداخلا بين مدة الحضن (يوم) و درجات الحرارة (ºم) , حيث سجلت مدة الحضن 5 يوم بدرجة 35˚م اقل معدل لنمو المستعمرة بواقع 0.5 سم ولم تختلف عن مدة الحضن 7 و 10 يوم و بدرجة حرارة 35˚م , فيما كان اعلى معدل لنمو المستعمرة في 9 يوم عند درجات الحرارة 10،15 ،20 و 25˚م . , لم يتأثر معدل قطر المستعمرة في مدة الحضن 5 , 7 و 10 يوم بدرجات الحرارة 10، 15 ، 20˚م.

الجدول (1) : تأثير درجة الحرارة (ºم ) و مدة الحضن (يوم) و التداخل بينهما في معدل النمو القطري للفطر  *S. sclerotiorum*(سم) النامي على الوسط PDA و pH 5.5

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| درجة الحرار ة  مدة الحضن (ºم**)**  (يوم) | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | المعدل |
| 5 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | **7.7** | 0.6 | 0.5 | 6.0 |
| 7 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 1.2 | 0.5 | 6.3 |
| 10 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 1.8 | 0.5 | 6.4 |
| المعدل | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 8.6 | 1.2 | 0.5 |  |

L.S.D0.05 : مدة الحضن = 0.2 درجات الحرارة = 0.3التداخل = 0.6

اما الاجسام الحجرية Sclerotia فبدأ ظهورها مع اليوم السابع من الحضن وبمرحلة البادئات Intiation عند درجات الحرارة 10 , 15 , 20 , 25 و 30 ºم وحتى اليوم التاسع من الحضن والذي وصلت الى مرحلة التطور و الزيادة في الحجم Development لتكمل نضجها في اليوم الثاني عشر فيما لم تظهر الاجسام الحجرية عند درجات الحرارة 35ºم وكما موضح في الجدول (2) .

الجدول (2) : درجة الحرارة (ºم ) و مدة الحضن (يوم) و التداخل بينهما في تخليق الاجسام الحجرية للفطر*S. Sclerotiorum* النامي على وسط PDA و pH 5.6

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| مدة الحضن(يوم) | درجات الحرارة (º م) | | | | | |
| 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 |
| 5 | - | - | - | - | - | - |
| 7 | I. | I. | I. | I. | I. | - |
| 10 | D. | D. | D. | D. | D. | - |
| 12 | M. | Mr. | M. | M. | M. | - |

- :عدم ظهور الاجسام الحجرية I. :ظهوربادئات الاجسام الحجرية

D. : مرحلة تطور الاجسام الحجرية M. : مرحلة نضوج الاجسام الحجرية

تعتبر درجة الحرارة من اهم العوامل البيئية المؤثرة في معدل نمو وتكاثر الفطر , ولكل فطر مدى حراري مفضل للنمو و التكاثر , و يتأثر الفطر *S. sclerotiorum* بشكل ملحوظ عند حدوث ارتفاع او انخفاض عن المدى المفضل له (Dillard واخرون ،1995), واظهرت النتائج ان للفطر *S. Sclerotiorum* مدى حراري يتراوح بين 10-20ºم مفضل للنمو و انتاج الاجسام الحجرية , يتوقف نموه عند 35ºم بشكل كامل . وهذا يتفق مع ما ذكره Coung و Dohroo ، (2006). بينما ذكر كل من Liew و Prange ، (1994) في ان درجة الحرارة 16ºم تعتبر هي الحرارة المثلى لنمو الفطر خضريا و ان الفطر قادر على النمو و انتاج الاجسام الحجرية حتى 35ºم ,اما Hartman وجماعته ، (2004)*.* فقد ذكروا ان للفطر قدرة على النمو بشكل طبيعي و احداث الامراضية على نبات فول الصويا عند درجة حرارة 25- 30ºم، وقد يعود هذا الاختلاف الى ظروف تجريبية ووراثية مثل اختلاف نوع العزلة او اختلاف المنطقة الجغرافية التي اخذت منها كل عزلة و ان هذا التأثير قد يكون ناتجا من حصول خلل في النشاط الايضي و الانزيمي للفطر حيث ان الارتفاع في درجات الحرارة يمكن ان يؤدي الى تحطيم عدد من الانزيمات مثل انزيم pectinaseو انزيم Polygalacturonase وغيرها( Rehman ،(2008) و Motalle،2009) ) ( .

أظهرت النتائج في الجدول (3) ، وجود فروقات معنوية في اليوم الخامس من الحضن مع كل من اليوم السابع والعاشر من الحضن، ولم يختلف اليوم السابع عن العاشر في معدل قطر المستعمرة. وسجل المستوى 5.5 اقل نمو واختلفت معنويا عن كل من 4.5 و 6.5 . ومن نفس الجدول ، يلاحظ ان اليوم الخامس وبمستوى 7.5 سجل اقل فرق معنوي في قطر المستعمرة واختلفت معنويا عن كل مدد الحضن ومستويات الـpH الاخرى، والتي لم تسجل اي تداخلات فيما بينها.

الجدول (3): تأثير كل من مستوى pH و مدة الحضن (يوم) في معدل قطر مستعمرة (سم) الفطر*S. Sclerotiorum* النامي على وسط PDA بدرجة حرارة 18 ± 2 ºم

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| pH  مدةالحضن  (**يوم)** | 3.5 | 4.5 | 5.5 | 6.5 | 7.5 | 8.5 | 9.5 | المعدل |
| 5 | 8.8 | 9.0 | 8.7 | 9.0 | 8.5 | 8.8 | 8.8 | 8.8 |
| 7 | 9.0 | 9.0 | 8.7 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 |
| 10 | 9.0 | 9.0 | 8.7 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 |
| المعدل | 8.9 | 9.0 | 8.7 | 9.0 | 8.8 | 8.9 | 8.9 |  |

L.S.D 0.05  مدة الحضن = 0.18 مستوى pH = 0.26 التداخل = 0.47

اما انتاج الاجسام الحجرية فلم تظهر اي اختلاف في مراحل تخليقها عند المستويات الاربع الاولى 3.5 , 4.5 , 5.5 و 6.5 ، بمرحلة البادئات Intiation في اليوم السابع من الحضن و من ثم مرحلة التطور Development عند اليوم العاشرعند 3.5-6.5PH وصولا الى النضج Maturation في اليوم الثاني عشر .فيما اظهرت المستويات 7.5 , 8.5 و 9.5 بقاء الاجسام الحجرية في مرحلة البادئات دون ان تتطور في نموها حتى اليوم الثاني عشر. ولم تظهر الاجسام الحجرية في مدة الحضن 5 يوم فضلا عن اليوم السابع عند pH 8.5 و 9.5 وكذلك عند pH 9.5 ولكافة ايام الحضن كما في الجدول (4). يعتبر الرقم الهيدروجيني عامل بيئي مهم في نمو الفطر وتطوره وان التغيرات التي تحصل في قيمة الرقم الهيدروجيني يمكن ان تؤثر في نشاط وفعالياته الحيوية المختلفة كنمو الغزل الفطري و انتاج الاجسام الحجرية والقدرة على احداث الامراضية على النبات العائل ( Bolton واخرون، 2006) . واظهرت النتائج ان الفطر *S.sclerotiorum* يمتلك القدرة على النمو في مدى واسع من الرقم الهيدروجيني يتراوح من 3.5 – 9.5. في حين ان انتاج الاجسام الحجرية ونضجها كان ينحصر عند الرقم الهيدروجيني الحامضي 3.5 – 6.5 فقط . وهذا يتوافق مع ما ذكره Coung و Dohroo ،(2006), حيث بين ان الفطر قادر على النمو في مدى يتراوح 4.0 – 8.0 من الرقم الهيدروجيني وان انتاج الاجسام الحجرية يضعف تدريجيا باتجاه القاعدية . واتفقت هذه النتائج مع ما توصل اليه كل من Agnihotri و Rai ،(1971), حيث بينا ان للفطر مدى واسع من الرقم الهيدروجيني 2. 5pH – 9.5pH مناسب لنمو الغزل الفطري ,

جدول ((4: تأثير كل من مستوى pH و مدة الحضن (يوم) في تخليق الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* النامي على وسط PDA بدرجة حرارة 18 ± 2 ºم

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| مدة الحضن  (يوم) | مستويات الـ pH | | | | | | |
| 3.5 | 4.5 | 5.5 | 6.5 | 7.5 | 8.5 | 9.5 |
| 5 | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | I. | I. | I. | I. | I. | - | - |
| 10 | D. | D. | D. | D. | I. | I. | - |
| 12 | M. | M. | M. | M. | I. | I. | - |

- :عدم ظهور الاجسام الحجرية I. :ظهوربادئات الاجسام الحجرية

D. : مرحلة تطور الاجسام الحجرية M. : مرحلة نضوج الاجسام الحجرية

اما انتاج الاجسام الحجرية فهو يفضل الرقم الهيدروجيني الحامضي ويقل انتاجها تدريجيا عند 7.5 pH ليتوقف كليا عند pH 8.0 .وذكر Bolton واخرون،(2006) ، ان الرقم الهيدروجيني الحامضي هو المفضل لانتاج الاجسام الحجرية للفطر وعند ارتفاع الرقم الهيدروجيني الى القاعدي فان الفطر يقوم بانتاج كميات كبيرة من حامض الاوكزاليك على الوسط لتنخفض قيمة الرقم الهيدروجيني الى الحامضي من جديد والذي هو يعتبر مناسب للنمو و عمل العديد من الانزيمات الضرورية لانتاج الاجسام الحجرية مثل انزيم mitogen-activated protein kinase (MAPK) المرافق لبناء الاجسام الحجرية. كما ان الاختلاف في الرقم الهيدروجيني يمكن ان يؤثر ايضا في انتاج الاجسام الحجرية للفطر من خلال التأثير في بناء صبغة الميلانين melanin التي لها الدور الاكبر في نضج الاجسام الحجرية وذلك من خلال التأثير في نشاط وفعالية عدد من الانزيمات الضرورية لبنائها (Butler واخرون ،( 2009 . كما يمكن ان يؤثر ايضا في جاهزية وعمل الانزيمات الضرورية لاختراق النبات واحداث الامراضية عليه مثل انزيم pectinase و انزيم cellulose(Motallebi واخرون، 2008).

اظهرت النتائج في الجدول (5)، ان اليوم العاشر من الحضن سجل اعلى نمو واختلف معنويا عن كل من اليوم الخامس والسابع ،كما وان اعلى معدل نمو على وسط الـ PDA واختلف معنويا عن الاوساط الاخرى التي هي وسط الزابك اكار CDA , المانيتول اكار MA و وسط الاكار المغذيNA , و يتبين من نفس الجدول ان معدل نمو الغزل الفطري قد تأثر معنوياً بالتداخل بين مدة الحضن ونوع الوسط الغذائي ، على الرغم من ان وسط الـ PDA غطى كامل الطبق منذ اليوم الخامس من الحضن وتفوق معنويا عن الاوساط الاخرى التي لم يغط فيها الفطر الطبق مطلقا . واظهر وسط MA في اليوم الخامس اقل معدل لنمو الفطر 0.62 سم .

اما انتاج الاجسام الحجرية فقد بدأت بالظهور بشكل طبيعي على الوسط PDA في حين تأخر انتاجها على الوسط الزابك اكار CDA حتى اليوم السابع حيث ظهرت بمرحلة البادئات لتبلغ مرحلة النمو و التطور عند اليوم الثاني عشر , فيما لم يظهر الفطر اي قدرة على انتاج الاجسام الحجرية الاوساط الاخرى، الجدول(6).

جدول (5) تأثير نوع الوسط المغذي و مدة الحضن (يوم ) و التداخل بينهما في معدل نمو الفطر *S. sclerotiorum* عند درجة حرارة 18 ± 2ºم و pH 5.6

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| نوع الوسط الغذائي  مدةالحضن  (يوم) | PDA | CDA | MA | NA | المعدل |
| 5 | 9.00 | 0.25 | 0.00 | 0.62 | 2.47 |
| 7 | 9.00 | 1.75 | 0.00 | 1.12 | 2.97 |
| 10 | 9.00 | 2.37 | 1.25 | 1.82 | 3.61 |
| المعدل | 9.00 | 1.46 | 0.42 | 1.19 |  |

L.S.D 0.05  : مدة الحضن = 0.60 نوع الوسط = 0.69 التداخل =1.20

PDA وسط البطاطا دكستروز اكار , CDA وسط الزابك اكار ,

MA المانيتول اكار ،NA وسط الاكار المغذي

الجدول (6) : تأثير اختلاف نوع الوسط المغذي و مدة الحضن (يوم ) و التداخل بينهما في تخليق الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* النامي بدرجة حرارة 18 ± 2ºم و pH 5.6

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| نوع الوسط  مدة الحضن  (يوم) | PDA | CDA | MA | NA |
| 5 | - | - | - | - |
| 7 | I. | - | - | - |
| 10 | D. | I. | - | - |
| 12 | M. | D. | - | - |

PDA وسط البطاطا دكستروز اكار , CDA وسط الزابك اكار , MA المانيتول اكار ،NA وسط الاكار المغذي

- :عدم ظهور الاجسام الحجرية I. :ظهوربادئات الاجسام الحجرية

D. : مرحلة تطور الاجسام الحجرية M. : مرحلة نضوج الاجسام الحجرية

تختلف قدرة الفطر بشكل عام على النمو على الاوساط الزرعية المختلفة , ويعود هذا الى الاختلاف في مكونات الوسط الغذائية ونسبها وطبيعتها الكيميائية في الوسط , مثل الاختلاف في مصدر الكاربون المضاف للوسط و جاهزية بعض العناصر الكيميائية الضرورية كالنيتروجين و الفوسفور( Bueno واخرون، 2012). ووجد ان افضل وسط لنمو الفطر *S.sclerotiorum* و انتاج الاجسام الحجرية هو وسط اكار دكستروز البطاطا PDA ,و قد يعود هذا الى وجود كميات كبيرة من سكر D- Glucose و التي تعتبر مصدر كاربون مفضل للفطر كذلك ان خلاصة البطاطا التي تحتوي على معظم العناصر الضرورية لنمو الفطر Peres ) واخرون ، ( 2002. ويليه وسط الزابك اكار بمعدل نمو قليل جدامع تباطأ تخليق الاجسام الحجرية ،ويليهما وسط الاكار المغذي NA.وهذه النتائج متفقه مع ما ذكره Mohamed،(2001) ، حيث بين ان الوسط PDA هو المفضل لنمو الفطر وانتاج الاجسام الحجرية ويليه وسط الاكار المغذي NA في حين ان الوسط CDA يعتبر اقل الاوساط تفضيلا من قبل الفطر وقد يعود هذا الاختلاف الى عوامل كيميائية كتركيز المكونات العضوية للوسط و توفر عدد من العناصر التي قد تعمل على تحفيز نمو الفطر و تثبيطه . كما وذكر Kim واخرون (2006) ، ان وسط PDA هو افضل وسط لنمو الفطر *S.sclerotiorum* وانتاج الاجسام الحجرية في 10 ايام فقط لجاهزية معظم العناصر الغذائية الضرورية للفطر.

اما الاجسام الحجرية الناتجة من خلفة الاجسام الحجرية المعاملة ادت الى نمو كامل فضلا عن انتاج اجسام حجرية طبيعية لم تختلف عن المقارنة وبهذا يمكن القول بان الظروف البيئية المهيئة لنمو الفطر وانتاجه للاجسام الحجرية، تؤدي حتما الى نمو طبيعي وانتاج اجسام حجرية طبيعية قادرة على تجديد حيوية الفطرشرط توفر الظروف الملائمة .

**Reference:**

-Agnihotri , J. P. & Rai , R . P. (1971). Influence of nutrition and pH on growth and sclerotia formation of *Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) De Bary from *Gaillardia pulchella* foug. Mycopathologia et mycologia Applicata. 43 : 89 – 95.

-Bolton, M. D. ; Thomma, B. P. H. J. & Nelson, B. D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen.Molecular Plant Pathology. 7( 1 ) :1–16.

-Bueno, E. A. ; Oliveira, M. B., Petrofeza, S., Andrade,R. V. & Junior, M. L. (2012). Effect of different carbon sources on proteases secreted by the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* during *Phaseolus Vulgaris* infection, Genet. Mol. Res. 11 (3): 2171-2181.

-Butler, M. J. ; Gardiner, R. B. & Day, A. W. (2009). Melanin synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum*. Mycologia. 101 : 296 – 304.

-Cuong, N. D. & Dohroo, N. P. (2006). Morphological, cultural and physiological studies on *Slerotinia sclerotiorum* causing stalk rot of cauliflower.Omonrice .14 : 71 – 77 .

-Dillard, H. R. ; Luding, J. W. & Hunter, J. E. (1995). Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination.Plant Disease. 79: 411- 415.

-Hartman, G. L. ; Vuong,T. D. , Hoffman, D. D. , Diers, B. W. , Miller, J. F. & Steadman, J. R. (2004). Evaluation of soybean, dry bean, and sunflower for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* . Crop Sci. 44 :777–783.

-Hassan , S. A. & Shahzad , S. (2004) . Effect of sea salt on in vitro growth of *Sclerotinia sclerotiorum*.Pak. J. Bot. 36: 677-682 .

-Kim, S. H. ; Jeon, Y., Kwon, H. & Nam, J. (2006). Characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from Paprika.Korean Society of Mycology. Mycobiology. 34(3): 154-157 .

-Kohn, L. M. (1979). A monographic revision of genus *Sclerotinia*. Mycotaxon. 9: 365-444.

-Lanoiselet, T. L. H. ; Lanoiselet, V. M. , Lewington, F. K. , Ash, G. J. & Murray, G. M. (2005). Survival of *Sclerotinia* sclerotia under fire . Australasian Plant Pathology. 34: 311–317.

-Liew, C. L. & Prange, R. K. (1994). Effect of ozone and storage temperature on postharvest diseases and physiology of carrots (*Daucus carota* L.). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119 (3) : 563–567.

- Matheron, M. E. & Porchas, M. (2005). Influence of soil temperature and moisture on eruptive germination and viability of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. Plant Dis . 89:50-54.

-Mila, A. L. & Yang, X. B. (2007). Effects of fluctuating soil temperature and water potential on sclerotia germination and apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum* . Plant Disease, 92 : 78 – 82 .

-Mohamed, F. G. (2001) Pathological, histological and biochemical studies on *Sclerotinia sclerotiorum* the causal agent of fruits rot, Egypt J. Phytopathol., 25 (1-2): 17 pp.

-Mohammed,B.T.2001.The biological study of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.)de- Bary and use of solar pasteurization for it's control . Ph.D. Thesis , Science College ,Babylon University .(in Arabic)

-Motallebi, M. ; Zamani, M.R. & Azad, H. A. (2008). Polygalacturonase production by *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of canola stem rot: parameter optimization using taguchi approach . World Applied Sciences Journal, 3 (1): 96-101.

-Partridge, D. E., Sutton, T. B., Jordan, D. L., Curtis, V. L., and Bailey, J. E. (2006). Management of Sclerotinia blight of peanut with the biological control agent *Coniothyrium minitans*. Plant Dis. 90:957-963.

-Peres , Â. P. ; Machado, J. D. C. &Nasser, L. C. B. (2002). Use of semi-seletive media for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on bean and soybean seeds , Fitopatol. Bras., 27(2): 123-127.

-Rehman, F. U. ; Aslam, M., Tariq, M. I. , Shaheen, A. , Sami, A. J., Naveed, N. H. & Batool, A. I. (2009). Isolation of cellulolytic activities from *Tribolium castaneum* (red flour beetle), African Journal of Biotechnology. 8 (23): 6710-6715.

-Rollins, J. A. & Dickman, M. B. (2001). pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identiﬁcation of A *Pacc/RIM1* homolog, Applied And Environmental Microbiology,67(1):75 - 81.

- Saharan, G. S. ; Mehta, N.K. 2008*. Sclerotinia* diseases of crop plants: biology, ecology and disease management .Springer Science+Business Media B.V. Library of Congress Control Number: 2008924858Library of Congress Control Number: 2008924858 ;pp: 384.

- Stevens,R.B.,(1981). Mycology Guidebook. University of Washington Press, Seattle, Washington. -Tariq, V.N.; Gutteridge , C.S. and Jeffries , P. (1985) . Comparative studies of cultural and biochemical characteristics used for distinguishing species within *Sclerotinia*. Trans. Br.Mycol.Soc.84(3),381-397.

-Tanrikut, S. & Vaughan, E. I. (1951) Studies on the physiology of *Sclerotinia sclerotiorum*, Phylopath. 41: 1099-1103.

-Wang, S. Y. C. & Tourneau, D. L. (1971). Carbon sources, growth, sclerotiom formation and carbohydrate composition of *Sclerotinia sclerotiorum.*Arch. Mikrobiol, 80 : 219- 233.