عزل وتشخيص مسببات مرض تعفن بذور وموت بادرات الحنطة ومكافحتها باستخدام بعض العوامل الإحيائية والكيميائية

محسن عبد علي الموسوي عدنان عبد الجليل لهوف علا هادي جعفر

قسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة كربلاء

المستخلص

أجريت هذه الدراسة لغرض عزل وتشخيص الفطريات التي تسبب مرض تعفن البذور وموت بادرات الحنطة مع تقييم كفاءة العامل الإحيائي *Bacillus thurigensis* (BT) وعامل الاستحثاث الكيميائي BION (BI) ومستخلص الطحالب البحرية Sea algae (MU) في مكافحة هذا المرض. بعد إجراء عملية العزل درست الخصائص المظهرية للعزلات الفطرية ثم قيمت قدراتها الامراضية. استخدمت بعدها تقنية الـPCR لغرض التحقق من العزلات الفطرية الأشد إمراضيه كما جرى تقييم للعوامل الثلاث أعلاه في مكافحة المرض في البيت البلاستيكية. أظهرت النتائج أن مسببات هذا المرض تعود إلى الجنسين الفطريين *Rhizoctonia* و*Fusarium* وكانت جميع العزلات الفطرية ذات إمراضيه عالية كما تم الحصول على DNA نقي وبكمية كافية من العزلات الفطرية لإجراء عملية الـ PCR بنجاح وذلك بعد إجراء تعديل بطريقة الاستخلاص. أوضحت النتائج أيضا القدرة التثبيطية الجيدة للبكتريا BT ضد جميع العزلات الفطرية الممرضة وبنسب تراوحت بين 68.05 – 87.21 %. كما أظهرت النتائج أفضلية واضحة للعوامل الإحيائية والكيميائية في مكافحة المرض وخاصة عند استخدامها بطريقة تكاملية حيث حققت المعاملات F1+BI+MU+BT و R1+BI +MU+BT أعلى نسب مئوية للإنبات بلغت 100% و 93.33% واقل نسب مئوية لتعفن البذور وموت البادرات بلغت 0.00% في كليهما وشدة اصابة والتي كانت 17% و 19.33% على التوالي. بالإضافة الى تحسين معايير النمو على نبات الحنطة مقارنة مع استخدام المبيد الكيميائي Benlet في تجربة البيت البلاستيكي. ان هذه البيانات قد تشير إلى أمكانية استخدام هذه العوامل الثلاث بطريقة تكاملية في مكافحة هذا المرض مع إمكانية الحفاظ على البيئة بنفس الوقت.

Isolation and diagnosis of the pathogens causing seed decay and damping-off disease on wheat and control them using some biological and chemical factors

Abstract:

This study was conducted to isolate and identify the causal agents of seed decay and damping-off disease on wheat. Additionally, the biological factor *Bacillus thurigensis* (BT), the chemical induction factor BION (BI) and the extract of sea algae (MU) were evaluated in control of this disease. After isolation process, the cultural features of the fungal isolates were investigated and their pathogenicity was assessed. The PCR technique was operated also to study the most pathogenic fungal isolates. Subsequently, the efficiency of the above three factors were evaluated in control of the disease in the plastic house. The results showed that the pathogens of

this disease were belonging to two fungal genus *Rhizoctonia* and *Fusarium*. As well as, all fungal isolates were highly pathogenic. Pure DNA with enough quantity was extracted from these fungal isolates in order to conduct a PCR reaction after manipulating of the DNA extraction process. The results displayed also good inhibition ability of the BT against all pathogenic fungal isolates with inhibition percentage ranged between 68.05-87.21%. Additionally, the biological and chemical factors selected in this study proved their efficiency in controlling of this disease particularly when they were applied in integrated method. F1+BI+MU+BT and R1+BI +MU+BT treatments caused the highest percentage of seed germination reached 100% and 93.33% in addition to the lowest percentages of seed decay and damping-off 0% in both of them and disease severity 17% and 19.33% respectively. Furthermore, the growth characteristics of wheat plants were significantly improved comparing with the Benlet fungicide treatment in plastic house experiment. The data of this study may indicate to possibility of applying these three factors together to control the seed decay and damping-off disease and possibility preserving of the environment simultaneously.

1: المقدمة

يوجد هنالك العديد من المشاكل التي تواجه عمليه زراعة نبات الحنطة (*Triticum aestivum* L.) والتي تسبب خفض كبير في انتاجه ونوعيته منها المسببات المرضية التي تصيبه في جميع أطوار نموه وتهاجم مختلف أجزائه مسببة الإمراض المختلفة التي تؤدي إلى تدهور إنتاجه كما ونوعا وحدوث الخسائر الاقتصادية خاصة عند توفر الظروف الملائمة، منها مرض تعفن بذور وموت بادرات الحنطة المتسبب عن الفطريات *Pythium* spp.، *Rhizoctonia solani*، *Fusarium* spp. (55,54,51,36,34,3).

بالرغم من أن استعمال المبيدات الكيميائية في مكافحة الإمراض النباتية و منها مرض تعفن بذور وموت بادرات الحنطة أثبتت كفاءة ملموسة بصورة عامة ولكن يعاب عليها أن لها تأثيرات سلبية على عناصر البيئة المختلفة والكتلة الإحيائية مما قد يؤدي إلى الأخلال في التوازن الطبيعي والتثبيط لأنشطة الإحياء المجهرية النافعة المستوطنة في التربة فضلا على إمكانية تأثيرها المباشر على صحة الإنسان والحيوان في حالة استخدامها بطريقة غير صحيحة (5) كما أن استخدمها يؤدي إلى زيادة تكاليف الإنتاج مع عدم ضمان فعالية تأثيرها خصوصا عند سيادة السلالات المرضية المقاومة لتأثيرها كل هذه الأسباب أدت إلى تحول مفهوم الإنتاج الزراعي في يومنا هذا من إستراتيجية الوصول إلى أقصى إنتاج إلى استراتيجية المستوى الأمثل للإنتاج مع ضرورة الارتقاء بنوعية المنتج ونظافته وخلوه من بقايا المبيدات وسميتها (1).

إن هذه الاستراتيجية الحديثة دفعت المختصين بمجال الأمراض النباتية إلى دراسة استخدام طرق أخرى للمكافحة تكون قليلة أو معدومة الأضرار الجانبية التي تنتج عادة عن استخدام المكافحة الكيميائية منها استخدام العوامل الإحيائية مثل البكتريا (*Bacillus thurigensis*) التي تمتاز بقدرتها على إنتاج البروتين البلوري أو الشفاف (Crystal protein) والذي يمتاز بسميته المتخصصة ضد الحشرات الضارة من رتبة

Lepidoptera ، Diptera و Coleoptera مع انعدام الآثار المتبقية له وعدم استهدافه للكائنات غير الضارة (56,40).

حيث استخدمت تقنية الهندسة الوراثية في نقل الجينات المسئولة عن تكوين البروتين البلوري من هذه البكتيريا إلى نباتات القطن والرز والذرة مما جعلها مقاومة للحشرات الضارة وهذا أدى إلى ارتفاع الإنتاج كما ونوعا وبالتالي تحقيق فوائد اقتصادية كثيرة للمزارعين (18). بالإضافة إلى فعاليتها ضد الحشرات الضارة أثبتت فعاليتها أيضا ضد المسببات المرضية الفطرية والبكتيرية التي تصيب النباتات (56) حيث حققت حماية عالية للعديد من العوائل النباتية ضد العديد من هذه المسببات المرضية وذلك عن طريق إنتاجها لمواد أخرى فعالة مثل المضاد الحيوي zwittermicin A والانزيم acyl homoserine lactone lactonases (38,35).

تعتبر طريقة استحثاث المقاومة الجهازية المكتسبة Systemic Acquired Resistance (SAR) في النبات من الطرق الصديقة للبيئة والطويلة أمد التأثير ضد العديد من المسببات المرضية حيث تعتمد في معظم الحالات على تكوين إشارات حامض السلسليك salicylic acid (SA) في داخل النبات(49) وهذه الإشارات مرتبطة بتفعيل مجموعة متخصصة من الجينات التي تسمى (SAR genes) والتي تشمل جينات تكون بروتينات ذات صلة بالامراضية تسمى pathogenesis-related (PR). تفعل هذه الطريقة نتيجة للإصابة ببعض بكتيريا التربة التي تهاجم وتستعمر جذور النباتات (23) كذلك يوجد هنالك بعض المركبات الكيميائية التي لها القدرة على تكوين هذا النوع من المقاومة مثل حامض السالسليك (SA) والمركبات الكيميائية التركيبية المشابه له منها عامل الاستحثاث الكيميائي Acibenzolar-s-methyl (ASM) حيث طور هذا المركب بواسطة شركة Syngenta وطرح للأسواق في العام 1996 كمحفز للنبات لمقاومة الأمراض النباتية (30).

إن عامل الاستحثاث (ASM) لوحده لا يمتلك نشاط مضاد للميكروبات ولكن سجل علميا انه وفر الحماية للعديد من أنواع النباتات من ذوي الفلقة الواحدة وذوي الفلقتين من الإصابة بالعديد من المسببات المرضية الفطرية والبكتيرية والفايروسية (26,17,9).

مستخلصات الطحالب البحرية Extract of sea algae تستخدم كمصدر عضوي مغذي في تحسين نمو وإنتاج النباتات وينتشر استخدامها على نطاق واسع في المجال الزراعي وتحضر أما بشكل مساحيق أو سوائل وذلك لأهميتها في تحفيز نمو النبات بتراكيز قليلة فضلا عن احتوائها على العناصر الغذائية الصغرى والكبرى والمواد المشجعة للنمو كالسايتوكاينينات والأوكسينات والجبرلينات والفيتامينات والأحماض الأمينية والعضوية ومركبات مشابهة للأوكسينات وسكريات متعددة (47,21).

ووجدا إن استخدام هذه المستخلصات يؤدي إلى الإسراع في إنبات البذور وقوة نمو الشتلات كما وتزيد من نمو الجذور والمجموع الخضري وكمية الحاصل وتحسين نوعيته وتؤخر شيخوخة الثمار كما وتزيد من مقاومة النبات للإجهادات الحيوية وغير الحيوية (16). كما أنها حققت دورا هاما في تقليل الإصابة بمختلف المسببات المرضية من خلال دعمها للنبات وتوفير الغذاء الذي بدوره يزيد من قدرة النباتات على المقاومة (4).

ونظر الأهمية محصول الحنطة في العراق باعتباره من المحاصيل الإستراتيجية ذات العلاقة بالأمن الغذائي والتي تحتم على المختصين ضرورة إيجاد طرق فعالة تواكب الاستراتيجيات الحديثة لمقاومة جميع الأمراض التي يتعرض لها ومنها مرض تعفن البذور وموت بادرات. هدفت هذه الدراسة إلى عزل وتشخيص مسببات مرض تعفن بذور وموت بادرات الحنطة وتقييم كفاءة العامل الإحيائي (*Bacillus thurigensis*) وعامل الاستحثاث الكيميائي (Acibenzolar-s-methyl) ومستخلصات الطحالب البحرية Extract of sea algae والتكامل بينهما في مكافحة هذا المرض.

2: المواد وطرائق العمل

2-1 : جمع العينات

جمعت عينات النباتات التي ظهرت عليها اعراض مرض تعفن البذور وموت البادرات والمتمثلة بتعفنات البذور وسيقان البادرات مع تلون الجذور بلون بني متدرج من الفاتح الى الغامق وأيضا ذبول واصفرار الاوراق خاصة السفلية منها من حقول الحنطة في موقع كلية الزراعة-جامعة كربلاء من الفترة 1 /3/ 2015 الى 4/7/ 2015. نقلت الى المختبر بعد وضعها في اكياس (بولي اثيلين) وتعليمها حيث حفظت في الثلاجة على درجة 4 مْ الى حين اجراء عملية العزل في اليوم التالي.

2-2:عزل وتشخيص وحفظ العزلات الفطرية

جرت عملية العزل من عينات النباتات المصابة التي جلبت الى المختبر حيث غسلت الجذور المصابة بالماء الجاري لمدة 5 دقائق لإزالة ما علق بها من تربة وبعدها قطعت الجذور الى اجزاء صغيرة بطول 0.5 – 1 سم وعقمت سطحيا بمحلول القاصر(هايبوكلورات الصوديوم تركيز1%) لمدة 3 دقائق ثم غسلت بعدها بالماء المقطر لمدة 5 دقائق ولثلاث مرات متتالية لإزالة اثار المادة المعقمة ثم ازيل الماء الحر منها بتجفيفها على ورق ترشيح معقم ونقلت القطع بعدها بواسطة ملقط معقم الى اطباق بتري بقطر 9 سم حاوية على الوسط الزرعي PSA (Potato Sucrose Agar) والمحضر بحسب الطريقة المعتادة المذكورة في العديد من المصادر مثل (5,4) بعدها نقلت جميع الاطباق الى الحاضنة على درجة 25 مْ ولمدة 3 ايام بعدها فحصت الاطباق وتم تنقية الفطريات النامية وفحصت بالمجهر المركب ثم شخصت باستعمال المفاتيح التصنيفية المعتمدة (32,11) حفظت عزلات الفطريات التي تم الحصول عليها في أنابيب اختبار تحتوي على الوسط الزرعي Potato carrot agar (PCA) المحضر بحسب الطريقة المذكورة في المصادر (27,5) وضعت بعدها الأنابيب بصورة مائلة لحين التصلب ثم لقحت بإضافة قرص بقطر0.5 سم أخذ من حواف المستعمرات بعمر 5 أيام، ووضعت الأنابيب الملقحة جميعها في الحاضنة عند درجة حرارة 25مْ لمدة 7 أيام بعدها وضعت في الثلاجة عند درجة حرارة 4 مْ الى حين الاستخدام.

2-3: اختبار القدرة الامراضية للفطريات المعزولة على بذور الفجل باستخدام طريقة الاطباق

أجريت عملية اختبار للقدرة الامراضية للفطريات المعزولة والتي تعود للجنسين *Rhizoctonia* و *Fusarium* على بذور الفجل الاحمر بحسب الطريقة المحورة (10) باستخدام اطباق بتري تحتوي الوسط الزرعي (Water Agar) حيث لقحت بالفطريات المعزولة والمشخصة ثم حضنت الاطباق جميعها بدرجة حرارة 25 مْ لمدة ثلاثة ايام بعدها زرعت بذور الفجل الاحمر المعقمة سطحيا بمحلول القاصر (هايبوكلورات الصوديوم تركيز 1%) بصورة دائرية قرب حافة النمو الفطري وبمعدل 15 بذرة / طبق. استعملت 4 اطباق لكل عزلة فطرية كمكررات بالإضافة الى معاملة المقارنة من دون فطر ممرض ووضعت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 25±1 مْ ثم اخذت النتائج بعد 7 ايام وذلك بحساب النسب المئوية للإنبات وتعفن البذور وموت البادرات والتثبيط وبحسب المعادلات ادناه (27):

$$\% \text{ للإنبات} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{\text{العدد الكلي للبذور}} \times 100$$

$$\% \text{ لتعفن البذور وموت البادرات} = \frac{\text{عدد البذور الميتة والبادرات الساقطة}}{\text{عدد البادرات النابتة الكلية في المقارنة}} \times 100$$

$$\% \text{ للتثبيط} = \frac{\text{معدل عدد البذور النابتة في معاملة المقارنة} - \text{معدل عدد البذور النابتة في المعاملة}}{\text{معدل عدد البذور النابتة في معاملة المقارنة}} \times 100$$

2-4:أختبار القدرة الامراضية لعزلات الفطريات *Rhizoctonia solani* و*Fusarium* spp.على حبوب الحنطة في الاصص

أجريت هذه التجربة في مختبر المقاومة الحيوية التابع الى قسم وقاية النبات في كلية الزراعة بتاريخ 5 / 4 / 2016 وبحسب تصميم تام التعشية (C. R. D.). تم تحضير لقاح العزلات الفطرية المعزولة في هذه الدراسة وذلك باستخدام بذور الدخن وبحسب الطريقة المذكورة في (27,5). عقمت تربة مزيجيه في جهاز التعقيم البخاري تحت درجة حرارة 121 مْ وضغط 1.5كغم /سم2 لمدة ساعة وكررت في اليوم التالي عملية التعقيم ووزعت بعدها التربة المعقمة بأصص بلاستيكية سعة 0.5 كغ بعد تعقيمها بمحلول القاصر(هايبوكلورات الصوديوم 1%) وغسلها بالماء المقطر وأضيف لقاح كل عزله من العزلات الفطرية بنسبة 0.01 (وزن/ وزن) وكررت ثلاث مرات لكل عزله بالإضافة الى معاملة المقارنة. زرعت بعدها الآصص ببذور الحنطة صنف اباء وسقيت كل ما احتاجت للماء وتم حساب النسب المئوية للإنبات وتعفن البذور وموت البادرات والتثبيط التي احدثتها عزلات الفطريات بعد اربعة اسابيع من يوم الزراعة وبحسب المعادلات المذكورة في الفقرة السابقة (5).

2-5: الاختبار الجزيئي

أجريت عملية استخلاص للDNA الكلي من عزلات الفطريات التي كانت اشد إمراضيه ضد بذور الفجل الاحمر والحنطة بحسب طريقة العمل المرفقة مع العدة DNeasy Plant Mini kit من شركة Qiagen

/المملكة المتحدة بعد اجراء بعض التعديلات في الخطوة الأولى من عملية الاستخلاص تمثل بالاستعاضة عن النايتروجين السائل الذي يستخدم لغرض تسهيل عملية تحطيم جدران خلايا الفطريات باستخدام حبيبات صلبة من مادة الزجاج glass beads متساوية الحجم 150-600 مليميتر من شركة Sigma-Aldrich/ الولايات المتحدة الامريكية معقمة بجهاز التعقيم البخاري لمدة 20 دقيقة وبنفس الظروف المذكورة في الفقرة السابقة حيث اضيف 5-10 ملغم تقريبا من الحبيبات الزجاجية لكل عينة. سحق بعدها النمو الفطري جيدا باستخدام هذه الحبيبات وبمساعدة Stick Homogenizer بعدها طبقت نفس الخطوات الموصئ بها من قبل الشركة المنتجة للعدة. جرت عملية تقييم النقاوة والتركيز باستخدام جهاز الـ Spectrophotometer والحفظ في المجمدة تحت درجة حرارة – 18مْ الى حين الاستخدام.

استخدم الـDNA المعزول من كل عزلة من الفطريات أعلاه كقالب في التفاعل البلمرة المتسلسل(PCR) Polymerase chain reaction القياسي الخاص بالكشف عن الفطريات باستخدام Ready-To-Go PCR Beads kit من شركة GE Healthcare /المملكة المتحدة. الحجم النهائي للتفاعل كان 25 مايكروليتر يحتوي على مكونات التفاعل الاساسية ومن ضمنها 1 مايكروليتر من كل من البادئات ITS1 و ITS4 الموضحة أدناه والتي تستهدف منطقة Internal transcribed spacer (ITS) في rDNA التي تقع بين جينات الوحدة الصغيرة والوحدة الكبيرة المكونة للرايبوسومات في كروموسومات الفطريات حيث تعتبر هذه البادئات من نوع (Universal primers) (53) بعدها اضيف للتفاعل 2 مايكروليتر من الـ DNA الكلي المعزول من الفطريات اعلاه.

Forward primer ITS1	5’TCCGTAGGTGAACCTGCGG3`
Reverse Primer ITS4	5’TCCTCCGCTTATTGATATGC3`

برنامج التضاعف PCR program:

يبدأ بخطوة التفكك Denaturation، لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 95 مْ ثم 35 دورة تتكون من ثلاثة مراحل: تبدأ بالتفكك لمدة 40 ثانيه وبدرجة حرارة 95مْ ثم الالتصاق Annealing لمدة 40 ثانيه بدرجة حرارة 55مْ بعدها التمدد Extension لمدة دقيقة بدرجة حرارة 72 مْ. بعدها تبدأ الخطوة الأخيرة للتفاعل المتمثلة بالتمدد النهائيFinal extension لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 72 مْ. ناتج التفاعل رحل باستخدام الترحيل الكهربائي على وسط Agrose تركيز1.5% بعد إضافة 5مايكروليتر من صبغة بروميد الاثيديوم وبعدها استخدام جهاز الاشعة الفوق البنفسجية لغرض فحص نتائج التفاعل. ناتج التفاعل الفائض حفظ بالمجمدة تحت درجة حرارة -18 مْ لغرض ارساله لاحقا الى الخارج الى احدى شركات المختصة بتحديد التسلسل النوكليوتيدي لعينات الـDNA.

6-2:اختبار القدرة التضادية للبكتريا *Bacillus thurigensis* (BT) ضد الفطريات الممرضة المعزولة

تم الحصول على عزلة مشخصه من البكتريا BT عن طريق ا.م.د. رجاء غازي عبد المحسن المحترمة من مختبر المقاومة الحيوية كلية الزراعة / جامعة كربلاء منماة على الوسط الزرعي PDA .نميت بعدها هذه العزلة على الوسط الزرعي السائل Nutrient broth (NB) المعقم (100 مل من الوسط في دورق سعة 250 مل) لغرض تنشيطها، حضن الدورق بدرجة حرارة 28مْ لمدة 2-3 ايام. تم تحضير اطباق حاوية على الوسط PDA المعقم ولقحت بالبكتريا بأخذ 1 مل من وسط التنشيط أعلاه بالماصات المعقمة واضافته الى الطبق مع تحريكه حركة رحوية لتوزيع اللقاح البكتيري على الوسط وبعدها لقحت الاطباق الحاوية على اللقاح البكتيري بالعزلات الفطرية الممرضة المعزولة وبواقع أربعة مكررات وذلك بوضع قرص قطره5 ملم من نموات الفطر في وسط الطبق مع معاملة المقارنة لكل عزلة فطرية حيث استخدم فيها المبيد الكيميائي Beltanol (Bel) واربعة معاملات مقارنة اخرى تمثل الفطريات الممرضة كل على انفراد من دون اي اضافة وبنفس عدد المكررات بعدها حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة 28مْ ولمدة 7 أيام وجرى بعدها قياس مقدار تثبيط نمو الفطريات وذلك بحساب قطر مستعمرة الفطر الممرض المنمى مع البكتريا وقياسه في معاملة المقارنة (29) وحسبت النسبة المئوية للتثبيط وفق المعادلة الاتية :

$$\text{\% للتثبيط} = \frac{\text{متوسط قطر مستعمرة المقارنة} - \text{متوسط قطر مستعمرة المعاملة}}{\text{متوسط قطر مستعمرة المقارنة}} \times 100$$

7-2:تقييم كفاءة البكتريا *Bacillus thurigensis* وعامل الاستحثاث الكيميائي (ASM) ومستخلص الطحالب البحرية والتكامل بينهما ضد مرض تعفن البذور وموت بادرات الحنطة

نفذت التجربة في البيت البلاستيكي التابع لكلية الزراعة / جامعة كربلاء حيث حضر اللقاح الفطري للعزلتين الفطريتين الأشد امراضية بالاعتماد على نتائج تجارب اختبار القدرة الامراضية للفطريات المعزولة على بذور الفجل (الفقرة 2-3) وحبوب الحنطة (الفقرة 2-4)، كل على انفراد باستخدام بذور الدخن وبحسب الطريقة المذكورة في (27,5). عقمت اصص بلاستيكية حجم 1 كغم بمحلول القاصر(هايبوكلورات الصوديوم تركيز 4-5%) ثم غسل بالماء عدة مرات بعدها وضع في كل اصيص 1 كغم تربة مزيجية معقمة مسبقا باستخدام جهاز جهاز التعقيم البخاري بنفس الظروف المذكورة في الفقرات السابقة ولكن لمدة 60 دقيقة (مع تكرار عملية التعقيم في اليوم التالي لضمان القضاء على كل السبورات والاحياء المجهرية التي قد تكون بقيت موجودة في هذه التربة) ثم اضيف اللقاح الفطري والبكتيري وبحسب المعاملات الموضح أدناه حيث اضيف لقاح العامل الاحيائي البكتريا*Bacillus thurigensis* (BT) المنماة على وسط NB بعمر 48 ساعة وبواقع 10 مل لكل اصيص . اما عامل الاستحثاث الكيميائي (ASM) فقد استخدم المستحضر التجاري الـ BION (BI) من شركة Syngenta / سويسرا وذلك بعد تحضيره بتركيز 0.75% غم/لتر (W/V) في تنقيع بذور الحنطة المعقمة

وبمعدل 1مل/1غم بذور لمدة 12ساعة قبل الزراعة وايضا اضيف محلول الـ BI رشاً بعد عشرة ايام من الزراعة وبتركيز 0.75 ملغم / لتر (31) بينما أضيف مستخلص الطحالب البحرية بهيئة مستحضر تجاريMU من شركة .Mani Dharma Biotech / الهند وبحسب توصية الشركة المنتجة له. اما اضافة المبيد الكيميائي Beltanol (Bel) من شركة Probelte .S . A / اسبانيا، فتمت بعد 24 ساعة من اضافة اللقاح وبتركيز 1 مل/لتر. بعدها زرعت الاصص جميعها ببذور الحنطة صنف أباء وتمت متابعتها يوميا واجراء عملية السقي. علما انه تم استخدام التصميم العشوائي الكامل .C.R.D في اجراء هذه التجربة وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة وكانت المعاملات على النحو الاتي:

1- المبيد Beltanol (Bel) لوحده + العزلة (R1) للفطر *Rhizoctonia solani* و(F1) للفطر *Fusarium* sp كل على انفراد.

2- عامل الاستحثاث الكيميائي BI لوحده + عزلات الفطريات الممرضة كل على انفراد .

3- البكتريا BT لوحدها + عزلات الفطريات الممرضة كل على انفراد .

4- مستخلص الطحالب البحريةMU لوحده+ عزلات الفطريات الممرضة كل على انفراد .

5- عامل الاستحثاث الكيميائي BI +البكتريا BT + عزلات الفطريات الممرضة كل على انفراد .

6- مستخلص الطحالب البحريةMU + عامل الاستحثاث الكيميائي BI +البكتريا BT+ عزلات الفطريات الممرضة كل على انفراد .

7- +CO عزلات الفطريات الممرضة كل على انفراد.

8- – CO اضافة بذور الدخن المعقمة فقط .

سجلت النتائج في كل معاملة ومنها استخرجت النسب المئوية للإنبات وتعفن البذور وموت البادرات ونسبة شدة الإصابة بالمرض بحسب الدليل المرضي الاتي :

1- النبات سليم لا توجد اصابة

2- الحجم الطبيعي للنبات مع تلون الجذور الثانوية بلون بني فاتح

3- الحجم اقل من الطبيعي مع تلون الجذور الثانوية والرئيسية بلون بني فاتح

4- اختزال حجم النبات مع تلون الجذور الرئيسية والثانوية بلون بني داكن وقاعدة الساق بلون بني فاتح

5- موت النبات

وحسبت النسبة المئوية لشدة الاصابة حسب معادلة (37):

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

كما حسبت اطوال النباتات والوزن الطري وحجم المجموع الجذري ثم حللت النتائج احصائيا.

3: النتائج و المناقشة

3-1:عزل وتشخيص الفطريات المسببة لمرض تعفن البذور وموت بادرات الحنطة

اظهرت النتائج ان المسببات المرضية لمرض تعفن البذور وموت البادرات على الحنطة تعود الى الجنسين *Fusarium* و*Rhizoctonia* حيث تم عزل عزلتين من كلى الجنسين وهما F1 وF2 تابعة للجنس *Fusarium* والعزلتين R 1 وR 2 تابعة للجنس *Rhizoctonia*. أن هذه النتائج جاءت متفقة مع العديد من الدراسات السابقة التي أثبتت تسبب العديد من أنواع هذين الجنسين في احداث مرض تعفن البذور وموت بادرات لمدى واسع من العوائل النباتية ومن ضمنها نبات الحنطة (5 ,6 ,15 ,19 ,20) .

اما سبب انتشار الاصابة بهذا المرض فقد يعود الى الزراعة المتكررة للمحصول مع ملائمة الظروف البيئية مما يؤدي الى تراكم اللقاح الفطري في الحقول اوقد يعود الى الاختلاف في اسلوب اضافة الاسمدة ونوعيتها وطرق ادارة التربة والتي قد تؤثر على النباتات وتجعلها ضعيفة وحساسة للمسببات المرضية المختلفة ومن ضمنها الفطريات أعلاه (7,1).

3-2:اختبارات القدرة الامراضية

3-2-1: اختبار القدرة الامراضية للفطريات المعزولة على بذور الفجل باستخدام طريقة الاطباق

اظهرت النتائج (الجدول 1) ان جميع العزلات الفطرية كان لها تأثير معنوي في خفض النسبة المئوية لإنبات البذور ورفع النسب المئوية لتعفن البذور وموت البادرات والتثبيط لنبات الفجل ، حيث تفوقت العزلة الفطرية الممرضة R1 في احداث اقل نسبة مئوية للإنبات بلغت 19.80% واعلى نسب مئوية لتعفن البذور وموت البادرات و للتثبيط بلغت 74.70% و79.00% بالتتابع، تلتها معاملة العزلة الفطرية الممرضة F1 بنسبة انبات 21.30% و نسب تعفن البذور وموت البادرات والتثبيط 73.20% و77.00% على التوالي، قياسا بمعاملة المقارنة وهي بذور الفجل بمفردها والتي بلغت فيها النسبة المئوية للإنبات 94.50% ونسبة تعفن البذور وموت البادرات والتثبيط 0.00%.

الجدول (1) الكشف عن القدرة الامراضية للفطريات المعزولة على بذور الفجل بطريقة الاطباق

رمز المعاملة	% للإنبات	% لتعفن البذور وموت البادرات	% للتثبيط
R1	19.80	74.70	79.00
F1	21.30	73.20	77.00
F2	36.50	58.00	61.00
R2	46.20	48.30	51.00
Control	94.50	0.00	0.00
L.S.D $_{0.05}$	8.93	1.62	1.6

3-2-2: أختبار القدرة الامراضية لعزلتي الفطريات *Rhizoctonia solani* و*Fusarium* spp. على حبوب الحنطة في الاصص

بينت النتائج (الجدول 2) ان جميع العزلات الفطرية التي تم اختيارها قد سببت خفض معنوي في النسبة المئوية لإنبات بذور الحنطة والذي انعكس بشكل مباشر على ارتفاع النسب المئوية لتعفن البذور وموت البادرات والتثبيط تحت ظروف البيت البلاستيكي، وكان اعلى خفض في نسبة الإنبات في معاملة العزلة الفطرية الممرضة R1 الذي بلغ13.33% بينما بلغت نسب تعفن البذور وموت البادرات والتثبيط فيها 80.00% و 85.83 % على التوالي تلتها معاملة العزلة الفطريةF1 والتي بلغت نسبة انباتها 32.67% في حين بلغت نسب تعفن البذور وموت البادرات والتثبيط فيها 60.66% و 64.37 % على التوالي. اما العزلتينF2 وR2 فكان تأثيرهما في النسبة المئوية للإنبات ضعيف نسبيا حيث بلغت 80.00% و 86.67% ونسبة تعفن بذور وموت البادرات بلغت 13.33% و 6.66% و نسبة تثبيط 14.16% و 7.08 %على التوالي، قياسا بمعاملة المقارنة التي بلغت النسبة المئوية للإنبات فيها 93.33% ونسب تعفن بذور وموت البادرات والتثبيط كانت 0.00%.

ان هذه النتائج تتفق مع ما وجد سابقا (42) من قدرة الفطر *R.solani* على خفض انبات بذور الحنطة وتعفنها وأيضا وجد ان الفطر *Fusarium* spp. احد اهم المسببات المرضية التي تصيب الحنطة وتسبب تعفن بذورها وجذورها (22). كما وجدا ايضا ان الفطر *Fusarium* spp ليس فقط يصيب الحنطة ويسبب الخسائر بالحاصل وانما يقوم بافراز السموم الفطرية مما يزيد من خطورة اصابتها (48).

قد يعزى سبب الاختلاف بين العزلات الفطرية في مدى تأثيرها في انبات بذور الفجل والحنطة الى التغاير الوراثي بينهما والذي قد يسبب في الاختلاف في كمية ما تفرزه هذه العزلات من السموم مثل Fusarubin و dihydrofusarubinوافراز الانزيمات المحللة لمادة اللكنين فيجدار خلايا العائل مثل Laccase و Lignin peroxidase وما لذلك من اهمية في احداث الاصابة وانتشار الفطر في تلك الخلايا المصابة حيث وجدى ان العزلات ذات القدرة الامراضية العالية تمتاز بإفرازها كمية اكبر من هذه المواد الايضية مقارنة بالعزلات ذات القدرة الامراضية الضعيفة وهذا ما اكده عدد من الباحثين (50,33,18,14).

الجدول (2) تأثير العزلات الفطرية على النسبة المئوية لإنبات بذور وبادرات نبات الحنطة تحت ظروف البيت البلاستيكي

رمز العزلة	% للإنبات	% لتعفن البذور وموت البادرات	% للتثبيط
R1	13.33	80.00	85.83
F1	32.67	60.66	64.37
F2	80.00	13.33	14.16
R2	86.67	6.66	7.08
Control	93.33	0.00	0.00
L.S.D $_{0.05}$	2.97	1.62	1.62

3-3:القدرة التضادية للبكتريا *Bacillus thurigensis* (BT) ضد الفطريات الممرضة المعزولة

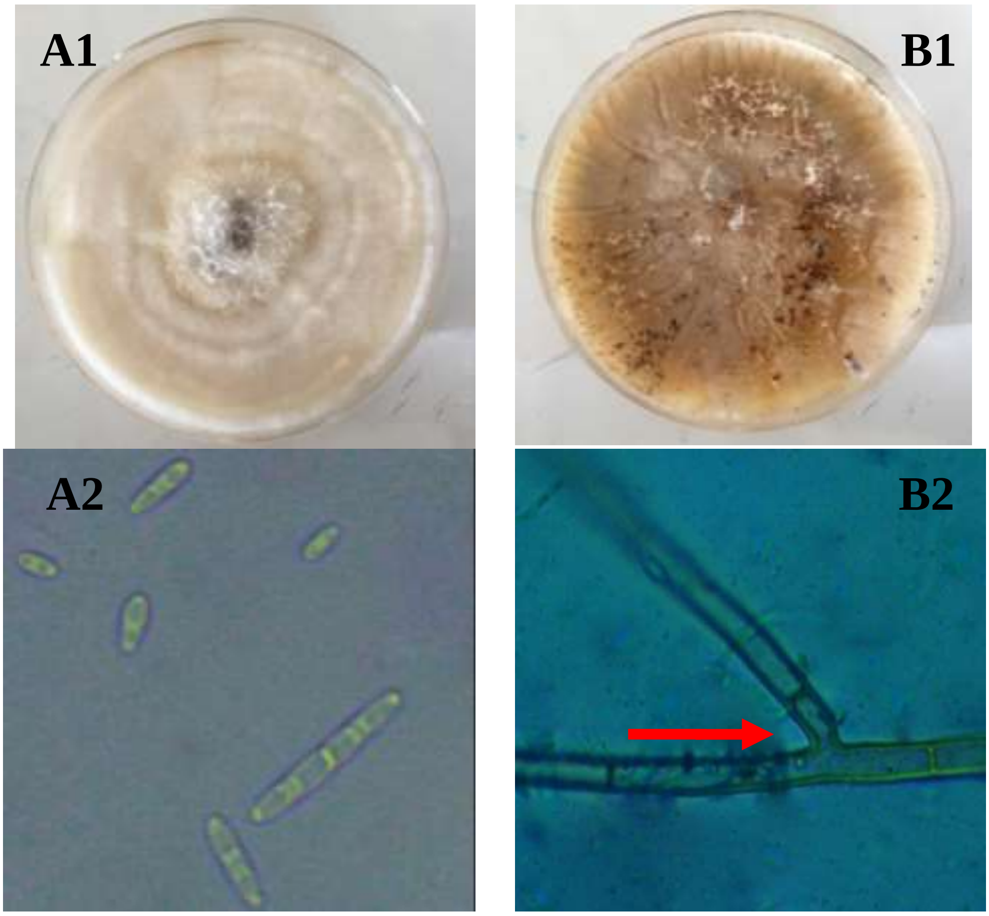
اوضحت نتائج اختبار تضاد البكتريا (BT) ضد العزلات الفطرية R2+R1+F2+F1 على الوسط الزرعي PSA (الجدول 3) قدرتها التثبيطية الجيدة ضد جميع العزلات الفطرية اعلاه وبنسب تراوحت بين 68.05 – 87.21 % وكانت اعلى نسبة تثبيط 87.21%ضد العزلة F1 ، تلتها نسبة تثبيط ضد العزلة R1 والتي بلغت 79.72% في حين بلغت نسب التثبيط ضد العزلتين F2+R2 75.55 و 68.05 % على التوالي قياسا مع معاملة المقارنة (العزلات الفطرية بمفردها) والتي كانت نسبة تثبيطها 0.0%. يمكن ان تعزى الفعالية ألتضادية العالية لهذه البكتريا ضد العزلات الفطرية الى قدرتها التنافسية العالية على شغل الحيز الحيوي من خلال نموها السريع وانتشارها على الوسط واستغلالها للمواد الغذائية المتواجدة فيه مما قد يسبب في منع نمو وامتداد الغزل الفطري الممرض. أيضا قدرتها العالية على انتاج العديد من المواد المضادة للفطريات مثل subtilin وBacteriacin وBacillomycin وافرازها انزيمي Chitinase وB-1-3 gluconase التي تؤدي الى تحلل جدران خلايا الفطر الممرض. بالإضافة الى انتاجها للمضادين الحيويين Zwittermicin A و Kanosamicin القادرين على تثبيط الفطريات الممرضة وبشكل فعال (56). تتفق هذ النتائج مع ما توصل اليه سابقا (44) من تأثير البكتريا BT على الفطر *Fusarium* spp المسبب لمرض تعفن جذور الحنطة. وكذلك قدرتها على منع مرض موت بادرات نبات الباقلاء المتسبب عن الفطر *medicaginis Phytophthora*(46) ان هذه النتائج يمكن ان توسع من آفاق استعمال هذا العامل الحيوي البكتيري ضد الممرضات الفطرية بالإضافة الى استخدامها ضد الآفات الحشرية. ولكن بالرغم من فعاليتها ضد العزلات الفطرية المدروسة في هذه الدراسة الا ان كفاءة المبيد الكيميائي Beltanol كانت اعلى من خلال تثبيطه جميع العزلات وبنسبة 100% وباختلاف معنوي عن جميع معاملات البكتريا BT وهذا قد يشير الى ضرورة استخدام هذه البكتريا بالتكامل مع عوامل أخرى لغرض رفع مستوى التأثير ضد المسببات الممرضة الفطرية.

الجدول (3) القدرة التضادية للبكتريا *Bacillus thurigensis* ضد العزلات الفطرية المختارة على الوسط الزرعي P.S.A

رمز المعاملة	% للتثبيط	رمز المعاملة	% للتثبيط
R1	0.00	F1+Bel	100.0
R2	0.00	F2+Bel	100.0
F1	0.00	F1+BT	87.21
F2	0.00	F2+BT	68.05
R1+Bel	100.0	R1+BT	79.72
R2+Bel	100.0	R2+BT	75.55
L.S.D $_{0.05}$	5.64		

3-4: الخصائص المظهرية والاختبار الجزيئي

بعد دراسة الخصائص المظهرية والمجهرية للعزلات الفطرية الأشد امرضية (F1+R1) من الفطرين *Rhizoctonia solani* و *Fusarium* spp على التوالي والموضحة في الشكل (1)



العزلة الفطرية R1 التي تعود للمسبب المرضي

Rhizoctonia solani

B1: الغزل الفطري بلون بني فاتح مع وجود نقط سوداء تمثل الأجسام الحجرية المتكونة على الوسط PDA

B2: الغزل الفطري المقسم مع وجود التخصر المميز في خلية بداية التفرع (موضحة بالسهم الاحمر).

العزلة الفطرية F1 التي تعود للمسبب المرضي

Fusarium spp.

A1 : الغزل الفطري ابيض كريمي على الوسط PDA.

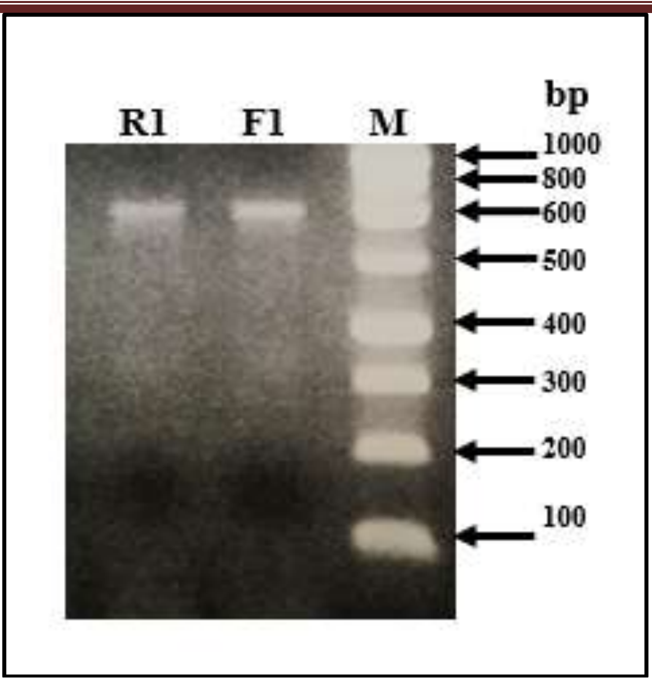
A2 : أبواغ كونيدية من نوع Microconidia و Macroconidi

الشكل 1: الصفات المظهرية والمجهرية للعزلات الفطرية الأشد امرضية من الفطرين *Rhizoctonia solani* و *Fusarium* spp.

اثبتت نتائج الاختبار الجزيئي نجاح خطوة استخدام الحبيبات الزجاجية glass beads بدلا عن النيتروجين السائل وذلك بالحصول على DNA نقي وبكمية كافية لأجراء عملية الـ PCR وبنجاح من خلال استخدام بادئات تستهدف منطقة Internal transcribed spacer (ITS) في rDNA والتي تعتبر منطقة محافظة في

عموم الفطريات وتستخدم لغرض تحديد انواع الفطريات للأغراض التصنيفية وذلك بعد التعرف على التسلسل ازواج القواعد النايتروجينية لها لذلك صممت العديد من البادئات التي ترتبط بهذه المنطقة مثل ITS1و2و3و4و5و6و7 (53) واستخدمت في هذه الاختبار البادئات ITS1 و ITS4 والتي اثبتت نجاحها في الارتباط بمنطقة ITS وحصول عملية التضاعف وذلك من خلال الحصول على ناتج نقي لعملية الـ PCR الشكل (2). وهنا لابد من الاشارة الى ان البادئات المستخدمة في هذا الاختبار هي من نوع Universal primersترتبط مع جميع الفطريات وتعطي ناتج يقدر بـ 600 زوج من القواعد النايتروجينية (bp) وكما هو واضح في نفس الشكل والتي بعد معرفة تسلسلها يتم تشخيص نوع الفطر اي ان عملية التشخيص هنا لا تتعلق بحجم ناتج عملية التضاعف وانما بمعرفة تسلسل القواعد النايتروجينية (53,12). هذا معناه ان الشكل (2) هو اثبات على ان الـ DNA المعزول من فطريات هذه الدراسة باستخدام الطريقة المحورة كان غير ملوث وان البادئات والظروف المستخدمة في هذا الاختبار كانت ناجحة في اجراء عملية التضاعف PCR وذلك من خلال عدم وجود نواتج PCR اخرى والتي قد تنتج في حالة اذا كان الـ DNA غير نقي او ان البادئات غير فعالة في الارتباط بالمنطقة المحددة وبطبيعة الحالة فان ناتج الـ PCR لهذا الاختبار سوف يكون كافي لأجراء عملية تحديد تسلسل ازواج القواعد النايتروجينية للعزلات الفطرية.

وهذه النتيجة تتفق مع العديد من الدراسات السابقة التي أثبتت فعالية هذه البادئات في تحديد أنواع الفطريات التي تعود الى أجناس مختلفة (12). ان عدم استخدام النيتروجين السائل في عملية استخلاص الـ DNA تعني تجاوز التكاليف الإضافية الخاصة بشراء هذا السائل والعبوات الخاصة به والمصممة وفق معايير خاصة تسبب ارتفاع اسعارها بالإضافة الى تجاوز المخاطر الصحية التي قد تحدث اثناء استخدامه بصورة خاطئة والمتمثلة بأحداث حروق جلدية او تلف للعين نتيجة لدرجة حرارته المنخفضة جدا والمتمثلة بـ −196مْ وكذلك تكاليف الدورات التدريبية الخاصة بمعرفة كيفية التعامل مع هذه المادة.



الشكل 2: الترحيل الكهربائي لناتج عملية الـ PCR الخاصة بالعزلة الفطرية (F1) التي تعود للمسبب المرضي *Fusarium* spp والعزلة الفطرية (R1) التي تعود للمسبب المرضي *Rhizoctonia solani* ، (M) هو Ladder حجم 100 bp

3-5:دور البكتريا BT وعامل الاستحثاث الكيميائي BI و مستخلص الطحالب البحريةMU في مقاومة مرض تعفن البذور وموت بادرات الحنطة

اوضحت النتائج (الجدول 4 ، الشكل 3) ان جميع المعاملات اثرت بشكل معنوي في رفع النسبة المئوية للإنبات وخفض النسبة المئوية لشدة الاصابة وتفوقت معاملات F1+BI+MU+BT و R1+BI +MU+BT في اعطاء اعلى نسب مئوية للإنبات بلغت 100% و 93.33% واقل نسبة مئوية لتعفن البذور وموت البادرات بلغت 0.00% في كليهما ونسب شدة الاصابة بلغت 17% و 19.33% بالتتابع، تلتها معاملات R1+BT+BI و F1+BT+ BI بنسب مئوية للإنبات بلغت 93.33% و 86.67% وكانت النسب المئوية لتعفن البذور وموت البادرات قد بلغت 0.00% و 6.66% في حين كانت نسب شدة الإصابة 35.00 % و36.33% على التوالي. اما معاملات R1+ MU +BT و F1+ MU +BT فقد سببت نسب مئوية للإنبات بلغت86.67% و80.00% ونسب مئوية لتعفن البذور وموت البادرات بلغت 6.66% و 13.33% اما نسبة شدة الاصابة فكانت 19.00% و21.00 % على التوالي. وحققت جميع المعاملات التكاملية أعلاه أفضلية على معاملات المبيد الكيميائي بمفرده R1+Bel وF1+Bel والتي بلغت فيهما النسبة المئوية للإنبات 40.00 % و 46.67% والنسبة المئوية لتعفن البذور وموت البادرات 53.33% و 46.66 % بينما بلغت النسبة المئوية لشدة الإصابة فيهما 40.00% و51.67% على التوالي. من جانب اخر كانت النسب المئوية للإنبات وتعفن البذور وموت البادرات وشدة الاصابة في معاملة المقارنة (بدون أي اضافات) قد بلغت 93.33% 0.00% بالتتابع. بينما في معاملات العزلات الفطرية الممرضة R1 وF1 بمفردهما كانت النسب

المئوية للإنبات 26.67% و33.33% وتعفن البذور وموت البادرات 66.60 % و 60.00 % وشدة الإصابة 98.33 % و 93.33% على التوالي.

وانعكس تفوق المعاملات التكاملية أعلاه في تحسين معايير نمو النبات معنويا والمتمثلة في الاطوال والوزن الطري كما توضح النتائج (الجدول والشكل 4) حيث تفوقت معاملة F1+ BI +MU+BT في اعطاء اعلى طول للنبات كان 21سم، قياسا بمعاملة المقارنة بدون اي اضافة ومعاملة العزلتين الفطريتين R1 وF1 بمفردهما والتي كانت اطوال نباتاتهما 13سم و8.73 سم و6.83 سم بالتتابع. واعطت معاملة R1+ MU +BT اعلى وزن طري للنبات بلغ 0.565غم تلتها معاملة F1+ MU +BT بوزن 0.522غم قياسا بمعاملة المقارنة والعزلات الفطرية بمفردها والتي كانت 0.130غم و0.091غم و0.110غم على التوالي.

الجدول (4) تأثير البكتريا BT وعامل الاستحثاث الكيميائي BI و مستخلص الطحالب البحرية MU والمبيد الكيميائي Bel في مقاومة مرض تعفن البذور وموت بادرات الحنطة

رمز المعاملة	% للانبات	% لتعفن البذور وموت البادرات	% لشدة الاصابة	اطوال النبات / سم	الوزن الطري / غم
R1	26.67	66.66	98.33	8.73	0.091
F1	33.33	60.00	93.33	6.83	0.110
R1+Bel	40.00	53.33	40.00	14.67	0.181
F1+Bel	46.67	46.66	51.67	12.50	0.174
R1+BT	80.00	13.33	20.00	18.67	0.247
F1+BT	86.67	6.66	22.00	15.00	0.176
R1+BI	73.33	20.00	31.00	17.00	0.221
F1+BI	66.67	26.66	30.67	15.33	0.173
R1+ MU	80.00	13.33	41.00	14.33	0.144
F1+ MU	86.67	6.66	45.00	19.33	0.172
R1+BT+BI	93.33	0.00	35.00	14.33	0.255
F1+BT+BI	86.67	6.66	36.33	18.00	0.177
R1+ MU+BT	86.67	6.66	19.00	16.33	0.565
F1+ MU +BT	80.00	13.33	21.00	12.00	0.522
R1+BI +MU+BT	93.33	0.00	19.33	18.00	0.340
F1+BI +MU+BT	100.0	0.00	17.00	21.00	0.391
Control	93.33	0.00	0.00	13.00	0.130
L.S.D $_{0.05}$	4.02	1.64	3.19	2.25	0.002

الشكل 3: يوضح تأثير العزلات الفطرية على نسبة الانبات ومعايير نمو بادرات الحنطة واشطاء النبات (1)

معاملة العزلة F1+BI+MU+BT و(2) معاملة R1+BI+ MU+BT و(3) العزلة F1 و(4) المقارنة بدون فطريات ممرضة (5) العزلة R1 (6) بذور متعفنة ناتجة من الاصابة بالفطرين كل على انفراد.

ان تفوق المعاملات المضاف لها البكتريا BT قد يعود الى انها توفر حماية خارجية للنبات في المنطقة المحيطة بالجذور الـRhizosphere وذلك من خلال منافستها للمسببات المرضية التي قد تهاجم البذور والجذور على العوامل الأساسية والضرورية للنمو كالمواد الغذائية وإفرازات الجذور (44). فضلاً عن مقدرتها على أنتاج العديد من المضادات الحيوية والانزيمات التي تحلل سايتوبلازم الخيوط الفطرية الممرضة (56) وهذه النتائج جاءت مطابقة لنتائج التجربة المختبرية والتي اثبتت قدرة البكتريا على تثبيط نمو العزلات الفطرية المختبرة جميعها. وهذه النتائج تتفق مع ما وجد من دور هذه البكتريا في تثبيط نمو انواع عديدة من الفطر الممرض *Fusarium* spp. الذي تصيب نباتات الحنطة الشتوية تحت الظروف المختبرية (52).

اما دور مستخلص الطحالب البحرية MU في حماية النباتات من الإصابة بهذا المرض فقد يعود الى توفيره المصادر الغذائية الضرورية المتمثلة بالعناصر الغذائية الكبرى والصغرى والتي يحتاجها النبات في نموه وتكاثره وأيضا تدعمه وتقويه في مقاومة مختلف الامراض النباتية التي قد تصيبه والتي من ضمنها هذه المرض (16,4).

إن دور BI في حماية النباتات قد يكون من خلال استحثاث المقاومة الجهازية في البذور والبادرات وذلك عن طريق تفعيل بعض الجينات التي تعمل على انتاج بعض الانزيمات مثل انزيم chitinase في النبات والذي يعمل على تحليل جدران خلايا المسببات المرضية التي تهاجم النبات مما يوفر حماية فعالة للنبات من الإصابة بالممرضات وهذا التأثير يوفر حماية داخلية للنبات (24). و هذا يتوافق مع نتائج العديد من الدراسات التي أظهرت ان عوامل الـ ASM قد وفرت حماية للنباتات من الإصابة بالعديد من المسببات المرضية (45,41,13).

بالرغم من عدم دراسة تأثير العوامل الكيميائية على العامل الاحيائي في هذه الدراسة بشكل مباشر الا ان النتائج اشارات الى ان المعاملات التي تشملهم جميعا كانت تأزريه وذلك من خلال تحقيقها اعلى نسبة انبات

واقل نسب لتعفن البذور وموت البادرات وشدة اصابة مع تحقيق تحسين ملحوظ في معايير النمو لنباتات الحنطة وهذه النتيجة تتوافق مع نتائج دراسات سابقة (5,4) اشارات الى امكانية استخدام العامل الاحيائي BT مع العامل الكيميائي BI.

4 : المصادر

1- **Agrios**, G.N. 2005 Plant pathology .5th ed. Academic Press .PP.952.

2- **Alexander**,M. 1977. Introduction to soil microbiology. John wiley and Sons. Inc, New York.

3- **Alguacil**,M. M.; Caravaca E.; Roldan A .2005. Changes in rhizosphere microbial activity mediated by native or allochthonous AM fungal in the reforestation at mediterranean degraded environment Biology and Fertility of Soil 41(1):59-68.

4- **AL-Humairi**, Y. N. 2014. Some aspects of integration in control of wilt disease Caused by a fungus *Fusarium oxysporumlycopersici* and diagnose its strains. PhD thesis. Faculty of Agriculture. Baghdad University. 150 p.

5- **AL-Musawi**, M. A. 2012. Identification of the causes of root and stem base rot disease of beans and resistance it using of some chemical and biological induction agents Master Thesis. Faculty of Agriculture. Baghdad University. 99 p.

6- **Anne**, E.D.; Patrick, E.L. and Denis, R.M. 2002. Rhizoctonia damping-off and stem rot of soybean. Ohio State University Extension Fact Sheet Plant Pathology.

7- **Asran,** A. A.; AbdElsalam K.A; Omar M.R. and Aly. A.A. 2005. Antagonistic potential of *Trichoderma* spp against *Rhizoctonia solani* and use of M13 microsatellite-primed PCD to evaluate the antagonist genetic variation .Agricultural Research center .Giza Egypt.550-561.

8- **Barreto**, D.; Babbitt S.; Gally M. and Perez B. A. 2003. *Nectria haematococca* cansing root rot in olive greenhouse plants revista de la Soiciedad Argentina de Horticultura, 32: 49 – 55.

9- **Benhamou**, N and Belanger RR 1998 . Benzothiadiazole mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. Plant Physiology 118: 1203–1212.

10- **Bolkan**, H.A. and Butler D.F. 1974 . Studies on heterokaryosis and virulence of *Rhizotonia solani*. Phytopathology 64: 513-522.

11- **Booth**, C. (1977) . Fusarium laboratory guide to the identification of the major species Common Wealth Mycological Institute, Kew, surrey, England. 58 pp.

12- **Bridge**, P. D.; Arora D. K., Reddy C. A. and Elander R. P. 1998. Applications of PCR in mycology. CAB International, Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK.

13- **Brisset**, M.N.; Cesbron S.; Thomson S.V. and Paulin J.P. 2000. Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defence related enzymes in apple and protects from fire blight. European Journal of Plant Pathology 106: 529–536.

14- **Bruce**, R.J. and West C.A. 1989. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. Plant Physiol. 91: 889-897.

15- **Burgess**, L.W. 1981. General Ecology. Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy. (eds. P.E. Nelson, T.A. Toussoun & R.J. Cook) pp.225-235. The Pennsylvania State University Press, University Park.

16- **Chouliaras**, V.; Tasioula, M.; Chatzissavidis C.; Therios, I. and Eleftheria, T. 2009. The effects of a seaweed extract in addition to nitrogen and boron fertilization on productivity, fruit maturation, leaf nutritional status and oil quality of the olive (Olea europaea L.) cultivar Koroneiki. J. Sci. of Food and Agric. 89(6): 984-988.

17- **Cole,** D.L. 1999. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. Crop Protection 18: 267–273.

18- **Crickmore**, N. 2006. Beyond the spore—past and future developments of Bacillus thuringiensis as a biopesticide. J Appl Microbiol 101:616–619.

19- **Cromey**, M.G.; Butler R.C.; Boddington H.J.; Moorhead A.R. 2002. Effects of sharp eyespot on yield of wheat (*Triticum aestivum*). New Zealand J. of Crop and Horticult. Sci. 30: 9-17.

20- **Diwan**, M. and Al-Bahadli A. 1985. Plant diseases. Ministry of Higher Education and Scientific Research. institutional Foundation – Baghdad .

21- **Eman**, A.; El-Moniem A. and Abd-Allah, A. S. E. 2008. Effect of green algae cells extract as foliar spray on vegetative growth, yield and berries quality of superior grapevines. Am. Euras. J. Agric. and Environ. Sci. 4 (4): 427-433.

22- **Freije**, A. N. and Wise, K.A. 2015. Impact of *Fusarium graminearum* inoculum availability and fungicide application timing on Fusarium head blight in wheat. J. Crop Protection. 77:139-147.

23- **Hammerschmidt**, R.; Metraux J.P. and van Loon L.C. 2001. Inducing resistance: a summary of papers presented at the first International symposium on induced resistance to plant diseases, Corfu, May 2000. Euro. J. of Plant Pathol 107:1–6.

24- **Heitz**, T; Segond S.; Kauffmann S.; Geoffroy P.; Prasad V.; Brunner F.; Fritig B. and Legrand M. 1994. Molecular characterization of a novel tobacco pathogenesis-related (PR) protein – a new plant chitinase/lysozyme. J. Molecular & General Genetics 245: 246–254.

25- **Hell**, M.; Hilpert A.; Kaiser W. and Linsenmair K. E. 2000. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs. J. of Ecol. 88: 645-654.

26- **Ishii,** H.; Tomita Y.; Horio T.; Narusaka Y.; Nakazawa Y.; Nishimura K. and Iwamoto S. 1999. Induced resistance of acibenzolar-Smethyl (CGA 245704) to cucumber and Japanese pear diseases. Eur. J. of Plant Pathol. 105: 77–85.

27- **Jaafar**, O. H. 2011. Biological and chemical Resistance to beans wilting disease caused by two fungi *Rhizoctonia solani* kuhn and *Fusarium solani* (Mart) Sacc. Master Thesis. technical College . Musayyib. 78 p.

28- **Jhooty**, J.S. and Bains S.S. 1976 . Studies on infection cushion formation in *Rhizoctonia solani* . Indian Phytopath. 29: 303-304 .

29- **Katon**, J. and Gamliel A. 1993. Suppression of major and minor pathogens by *Pseudomonosfluorescens* in solarized and non-solarized. Soil Phyto. 83: 68-75.

30- **Kessmann,** H.; Oostendorp M.; Staub T.; Goerlach J.; Friedrich L.; Lawton K. and Ryals J. 1996 . CGA 2455704: Mode of action of a new plant activator (pp 961–966) Brighton Crop Protection Conference.

31- **Khudair**, W. M. 2007. Integrated control to root rot disease of citrus caused by a fungus, *Fusarium solani*. PhD thesis. Faculty of Agriculture. Baghdad University .134 p.

32- **Leslie**, J. F. and Summerell B.A. 2006. The Fusarium laboratory manual. 388 PP.

33- **Lozovaya**, V.V.; Lygin A.V.; Zernova O.V.; Li S.; Widholm J.M. and Hartman G.L. 2006. Lignin degradation by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. Plant Dis. 9:77-82.

34- **Martin**, A. ; Bovill W. D.; Percy C. D. ; Herde D.; Fletcher S.; Kelly A.; Neate S. M. and Sutherland M. W. 2015. Markers for seedling and adult plant crown rot resistance in four partially resistant bread wheat sources Theoretical and Applied Genetics, 128: 377-385.

35- **Marzban**, R. 2012. Investigation on the suitable isolate and medium for production of *Bacillus thuringiensis*. J. Biopest. 5(2): 144-147.

36- **McMullen**, M.; Bergstrom G.C.; DeWolf E.; Dill-Macky R.; Hershman D.; Shaner G.; and Sanford D. 2012. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: Fusarium head blight. J. Phytopathol. 96(12): 1712-1728.

37- **Michenny**, H. H. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporiumsativum* . J.Agri. Res. 26:195- 217.

38- Petti, C.; Khan M.; Doohan F. 2010. Lipid transfer proteins and protease inhibitors as key factors in the priming of barley responses to Fusarium head blight disease by a biocontrol strain of *Pseudomonas fluorescens*. Funct Integr Genomics 10: 619.

39- Pizza, F.A ; Siloto A.P. and Carvalho C.V. 1999. Production of chitonase from *Bacilluscerus*. Brazilian of Chemical Engineerring Saopaul . Brazil.16: 2.

40- Roh, J.Y.; Choi J.Y.; Li M.S.; Jin B.R. and Je Y.H. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. J. Microb. Biotechnol 17:547–559.

41- Scarponi, L.; Buonaurio R. and Martinetti L. 2001. Persistence and translocation of a benzothiadiazole derivative in tomato plants in relation to systemic acquired resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Pest Management Science 57: 262–268.

42- Schillinger, W. F. and Paulitz T. C. 2006. Reduction of Rhizoctonia bare patch in wheat with barley rotations. Plant Dis. 90:302-306.

43- Schroth, M.N. and Cook R.J. 1964 . Seed exudation and its influence on pre-emergence damping-off bean. J. Phytopathol. 54 :670-673.

44- Shi, U.; Yan P.; Li J.; Wu H.; Li Q. and Guan S. 2014. Biocontrol of *Fusarium graminearum* Growth and Deoxynivalenol Production in Wheat Kernels with Bacterial Antagonists Int. J. Environ. Res. Public Health. 11:1094-1105.

45- Siegrist, J.; Glenewinkel D.; Kolle C. and Schmidtke M. 1997. Chemically induced resistance in green bean against bacterial and fungal pathogens. J. of Plant Dise. and Prot. 104: 599–610.

46- Silo-Suh, L.A.; Lethbridge B.J.; Raffel S.J.; He H.; Clardy J.; Handelsman J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. Appl Environ Microbiol. 60:2023–2030.

47- Spinelli, F.; Giovanni F.; Massimo N.; Mattia S. and Guglielmo C. 2009. Perspectives on the use of a sea weed extract to moderate the negative effects of alternate bearing in apple trees. J. Hort. Sci. Biotechn. 17(1): 131-137.

48- Stepień, L. and Chelkowski J. 2010. Fusarium head blight of wheat: pathogenic species and their mycotoxins. World Mycotoxin J. 3: 107-119.

49- Sticher, L.; Mauchmani B. and Metraux J.P. 1997. Systemic acquired resistance. Annual Rev. of Phytopathol.35: 235–270.

50- Tatum, J. H. and Baker R.A. 1983. Naphthoquinones produced by *Fusarium solani* isolated from citrus. J. Phytochemist. 22: 543-547.

51- Unal, F.; Dolar F.S.; Yildirim A.F. and Demirci E. 2014. Isolation and Identification of Binucleat *Rhizoctonia* spp. from Wheat Field

Soils in the Central Anatolia Region, Turkey. Turkish J. of Agricul. and Natural Sci. Special. 2:1933 – 1938.

52- Wachowska, U.; Kucharska K.; Jedryczka M.and Lobik N. 2013. Microorganisms as Biological Control Agents against Fusarium Pathogens in Winter Wheat. Pol. J. Environ. Stud. 22 (2):591-597.

53- White, T.J.; Bruns T.; Lee S. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.

54- Zarrin, F.; Saleemi M.; Zia M.; Sultan T.; Aslam M.; Rehman R. and Chandhary M. F. 2009. AntiFungal activity of plant growth promoting Rhizobactera isolates against *Rhizoctonia solani* in wheat. African J. of Biotechnol. 8: 219-225.

55- Zhang, L.; Luo P.; Ren Z. and Zhang H. 2011. Controlling Fusarium head blight of wheat (*Triticum aestivum* L.) with genetics. Adv. in Bioscience and Biotechnol.2: 263-270.

56- Zhou, Y.; Choi Y.; Sun M. and Yu Z. 2008. Novel roles of *Bacillus thuringiensis* to control plant diseases. Appl Microbiol Biotechnol 80:563–572.