Effect of Some Agricultural Media and pH on the Growth of Sclerotinia sclerotiorum and Oxalic Acid Production.

تأثير بعض الاوساط الزرعية والرقم الهيدروجيني في نمو الفطر Sclerotinia sclerotiorumوانتاج حامض الاوكزاليك

ميثم ناصر نعمة الجبوري * بان طه محمد
قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء
* مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول.

المستخلص :

أجريت سلسلة من التجارب المختبرية في مختبرات قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء , في مختبرات الدراسات العليا. استعملت عدد من الاوساط الغذائية تمثلت بوسط البطاطا دكستروز أكار Potato Dextrose Agar (PDA) و وسط الزابك Czapek Dox Agar (CDA)و وسط الشوفان Oat Agar و وسط سابرويد دكستروز اكار Sabrouaud Dextrose Agar (SDA) ، واعتمدت سلسلة من الارقام الهيدروجينية هي 5 و 5.5 و 6 و 6.5 و 7 و 7.5 . بينت النتائج أن اعلى نمو للفطر كان في وسط PDA و CDA و افضل رقم هيدروجيني لنمو الفطر كان 7 . ان اعلى نسبة مئوية لحامض الاوكزاليك حصلت في وسط SDA بعد سبعة ايام من الحضن بدرجة حرارة 20± 2 ^{O}م ورقم هيدروجيني 7 .

Abstract:

Series of Lab. experiments were conducted in the lab. of higher studies , Biol . Dept. Coll. of Edu.for pure Science , Kerbala'. Univ. Numbers of nutritional media were used represented by Potato Dextrose Agar (PDA) , Czapek Dox Agar(CDA), Oat Agar and Sabrouaud Dextrose Agar (SDA). Series of pH values were applied namely 5.0,5.5,6.0,6.5,7.0 and 7.5 .Results revealed that higher growth of the fungi was obtained from PDA and CDA, the best pH value was 7.0 . The highest percentage of oxalic acid was obtained from SDA after 7 days of incubation at 20 ± 2^{0} C with pH 7.

المقدمة

تعد المغذيات من المواد الاساسية في البناء الحيوي و تحرير الطاقة و تساهم في بقاء الكائن على قيد الحياة ، و يعتبر مصـــدر الغذاء عامــلا محددا لنمو وشدةالامراضية للفطريات (1)، فالعناصر الغذائية الكبرى مثل الكاربون و النيتروجين و الاوكسجين و الهيدروجين و الكبريت و الفسفور هي مكونات مكملة للكاربوهيدرات و الدهون و البروتينات و الاحماض النووية و جميع هذه المكونات تعمل على تنشيط عمليات انتاج المواد الايضية و التي توجد بصورة مباشرة او غير مباشرة في التفاعلات بين الممرض و العائل (2) ، ويعتبر الكاربون و النيتروجين من العناصر الغذائية الرئيسة و الاساسية في العمليات الوظيفية و التركيبية عند الفطريات (3)، و تكون موجودة في اليات الدفاع الذاتي و الوسائل التي تمكن الكائن الحي من مواجهة الظروف البيئية المختلفة (4)، إذ وجد ان الفطر *S. sclerotiorum* يستخدم السكروز و الدكستروز وبشكل متساوي من اجل النمو في حين، يستخدم الكلوكوز و اللاكتوز كمصادر للكاربون لبناء الاجسام الحجرية و ايضا للنمو(5; 6; 7) ، و ان عددا من مصادر الكاربون و من ضمنها ما موجود في الجدار الخلوي للنبات على اعتبار انه مصدر الكاربون الوحيد يمكن ان تساهم في تراكم حامض الاوكزاليك بوصفه عامل امراضية مهم في الفطر *S. sclerotiorum* (5; 8 ; 9). كما تبين ايضا ان الكاربوهيدرات البسيطة و المركبة قد عملت على تحفيز النمو و تخليق الاوكزالات في الفطر *S. sclerotiorum* (10). لقد لوحظ ان تراكم الاوكزالات و هي املاح حامض الاوكزاليك الذي يعد عامل امراضية مهم جدا قد ازداد مع وجود الكلوكوز و بعض مصادر الكاربون الاضافية مثل Malate و Acetate(11 ; 12) . يشكل النتروجين ثاني اهم عنصر مهم للفطريات وهو عنصر اساسي في تركيب و حيوية الفطريات ويستخدم الفطر *S. sclerotiorum*نترات النيتروجين و نترات البوتاسيوم و نترات الصوديوم و نترات الكالسيوم و ايضا املاح الامونيوم للنمو و تحفيز تكوين الاجسام الحجرية و تبين ان الفطريات النامية في وسط حاوي على النترات انتجت كميات كبيرة من حامض الاوكزاليك ، بينما الفطريات النامية في وسط يحتوي على الامونيوم انتجت مقدار قليل من حامض الاوكزاليك (13)، و اوضحت الدراسات ان الاحماض الامينية تمثل اكثر مصادر النيتروجين اهمية بالمقارنة مع النترات و الامونيوم (14)، فضلا عن اهمية العناصر الغذائية ،وجد ان الرقم الهيدروجيني pH يعمل على تنظيم تراكم الاوكزالات ، اذ تزداد عملية تكوين الاوكزالات بزيادة pH الوسط و يساهم في استمرار النمو و يسيطر على عملية تخليق الاجسام الحجرية ضمن مدى معين ، حيث ان الفطريات تختلف بالنسبة للنوع او بالنسبة للأفراد في داخل النوع في تحملها للرقم الهيدروجيني الذي يؤثر

على تكوين الاجزاء التكاثرية (15) أما الرقم الهيدروجيني pH لوسط النمو فقد تبين انه مهم جدا للفطر *S. sclerotiorum* ، اذ بامكان الفطر تحمل مدى واسع من pH ،إلا ان افضل pH للنمو و تكوين الاجسام الحجرية ما بين 4 – 5.5 (16 ; 7) ، كما وجد ان pH الوسط الزرعي منظم قوي لإنتاج حامض الاوكزاليك حيث يزداد انتاج الحامض في البيئة الحامضية (17) ، و بينت بعض الدراسات ان الرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي يستمر بالتغير بأتجاه الحامضية بسبب النشاط الايضي للفطر *S. sclerotiorum* و الذي يتضمن انتاج بعض الاحماض مثل Malic Acid (10 ; 15) ،وكذلك يمكن تحفيز انتاج حامض الاوكزاليك في الفطر *S. sclerotiorum* بوساطة انزيم Oxaloacetate Acetylhydrolase و ان نشاط الانزيم يزداد مع زيادة pH البيئة المحيطة (18) .

هدفت التجربة في دراسة مكونات الوسط الغذائي والتغير في pH الوسط واهميته في انتاج حامض الاوكزاليك كعامل مهم في امراضية الفطر *S. sclerotiorum*.

المواد و طرائق العمل:

1- الاوساط الغذائية المستخدمة:

أ-وسط البطاطا دكستروز أكار Potato Dextrose Agar (PDA)

حضر الوسط الجاهز من انتاج شركة HIMEDIA – India بإذابة 39 غم من مسحوق الوسط في لتر واحد من الماء المقطر . اضيف الى الوسط المضاد الحيوي Chloramphenicol بمقدار 250 ملغم/لتر ثم وزع في دوارق زجاجية سعة 250 مل و سدت فوهاتها بسداد قطني محكم و عقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 ^{o}م و ضغط 15 باوند / إنج2 لمدة 20 دقيقة بعدها ترك الوسط ليبرد ثم صب في اطباق بتري بحسب الغرض من التجربة .

ب- وسط الزابك Czapek Dox Agar (CDA) :

حضر الوسط بحسب طريقة (19) و ذلك بإذابة 20 غم من الأكار – أكار في 500 مل من الماء المقطر في دورق زجاجي ، و أذيبت باقي مكونات الوسط و التي تشمل 30 غم سكروز و 2 غم $NaNO_3$ و 1 غم K_2HPO_4 و 0.5 غم من $MgSO_4$ و 0.5 غم من KCL و 0.01 غم من $FeSO_4$ في 400 مل من الماء المقطر في دورق زجاجي ثاني ، بعد ذلك مزجت محتويات الدورقين في دورق زجاجي واحد و اكمل الحجم الى 1 لتر . اضيف الى الوسط المضاد الحيوي Chloramphenicol بمقدار 250 ملغم/لتر ثم وزع في دوارق زجاجية سعة 250 مل و سدت فوهتها بسداد قطني محكم و عقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 ^{o}م و ضغط 15 باوند / إنج2 لمدة 20 دقيقة بعدها ترك الوسط ليبرد ثم صب في اطباق بتري بحسب الغرض من التجربة .

ج- وسط الشوفان Oat Agar (OA) :

حضر الوسط باذابة 50 غم من دقيق الشوفان مع 18 غم من الأكار – أكار في 1 لتر من الماء المقطر . اضيف الى الوسط المضاد الحيوي Chloramphenicol بمقدار 250 ملغم / لتر ثم وزع في دوارق زجاجية سعة 250 مل و سدت فوهاتها بسداد قطني محكم و عقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 ^{o}م و ضغط 15 باوند / إنج2 لمدة 20 دقيقة بعدها ترك الوسط ليبرد ثم صب في اطباق بتري بحسب الغرض من التجربة (20).

د- وسط سابرويد دكستروز اكار Sabrouaud Dextrose Agar (SDA) :

حضر الوسط الجاهز من انتاج شركة HIMEDIA – India بإذابة 65 غم من مسحوق الوسط في لتر واحد من الماء المقطر . اضيف الى الوسط المضاد الحيوي Chloramphenicol بمقدار 250 ملغم / لتر ثم وزع في دوارق زجاجية سعة 250 مل و سدت فوهاتها بسداد قطني محكم و عقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 ^{o}م و ضغط 15 باوند / إنج2 لمدة 20 دقيقة بعدها ترك الوسط ليبرد ثم صب في اطباق بتري بحسب الغرض من التجربة .

صبت الاوساط الغذائية بشكل منفرد في اطباق بتري و بواقع أربعة مكررات لكل وسط غذائي، لقحت الاطباق بقرص قطره 5 ملم مأخوذ بواسطة ثاقب الفلين Cork Borer من حافة مستعمرة الفطر *S. sclerotiorum* النامي على الوسط الغذائي PDA بعمر خمسة ايام و حضنت الأطباق بدرجة حرارة 20 ± 2 ، وتم تقدير نمو الفطر بأخذ معدل قطرين متعامدين من ظهـــر المستعمرة يمـــــران بمركز القرص بعد خمسة و سبعة ايام من الحضن (16).

2- الرقم الهيدروجيني pH :

لدراسة تأثير pH في نمو الفطر S. sclerotiorum ، اعتمدت سلسلة من الارقام الهيدروجينية 5 و 5.5 و 6 و 6.5 و 7 و 7.5 ، وزع الوسط PDA على ست دوارق زجاجية بحجم 250 مل و بعد تعقيمها بجهاز التعقيم البخاري عدلت الأرقام الهيدروجينية للأوساط وتحت ظروف التعقيم الى 5 و 5.5 و 6 و 6.5 بإضافة قطرات من حامض الهيدروكلوريك (HCL) 5 عياري و الى الأرقام 7 و 7.5 بإضافة قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) المركز صبت الاوساط في اطباق بتري و بواقع أربعة مكررات لكل رقم هيدروجيني و بعد تصلب الوسط في الأطباق لقحت بقرص قطره 5 ملم مأخوذ بواسطة ثاقب الفلين من حافة مستعمرة الفطر S. sclerotiorum النامي على الوسط الغذائي PDA بعمر خمسة أيام و حضنت الأطباق بدرجة حرارة 20 ± 2 مo ، و تم قياس نمو الفطر كما في الفقره اعلاه بعد خمسة و سبعة أيام من الحضن (16) .

3 –تقدير النسبة المئوية لحامض الأوكزاليك Oxalic Acid:

تم تقدير النسبة المئوية لحامض الاوكزاليك من الفطر S. sclerotiorum النامي على وفق ما جاء في الفقرتين 1 و 2 ، إذ تم تقطيع الوسط الغذائي النامي عليه الفطر بعمر سبعة بواسطة سكين معقمة على شكل قطع صغيرة بعدها نقلت القطع بواسطة ابرة معقمة الى خلاط كهربائي يحتوي على 25 مل ماء مقطر معقم لكل طبق و من ثم مزج الخليط لمدة عشرة دقائق بعدها

تم ترشيح المزيج بواسطة ورق ترشيح ،ثم اخذ الراشح و وضع في دوارق نظيفة و معقمة حجم 100 مل و كل دورق يحتوي 25 مل من الراشح استنادا الى(16) . بعد ذلك قدرت النسبة المئوية لحامض الأوكزاليك Oxalic Acid وفقا للطريقة الموصوفة من قبل (21) بواسطة التسحيح مع برمنغنات البوتاسيوم $KMnO_4$ (0.02 عياري) حتى ظهور اللون الوردي و حسبت النسبة المئوية للحامض على اساس ان كل 1 مل (0.02 عياري) من برمنغنات البوتاسيوم تعادل 1.2653 ملغم لحامض الأوكزاليك .

النسبة المئوية لحامض الأوكزاليك = الحجم المستهلك من البرمنغنات × 1.2653

4- التحليلات الاحصائية :

حللت نتائج التجارب وفق نموذج التجارب العاملية بالتصميم العشوائي التام Completely Randomized Design و بواقع أربع مكررات ، و استخدم اختبار اقل فرقا معنويا (L.S.D.) و على مستوى احتمالية 0.05 (22) .

النتائج و المناقشة :

أشارت النتائج في الجدول (1)، وجود فروقات معنوية في معدلات نمو الفطر في الاوساط الغذائية ، واعطى وسط CDA اعلى مستوى لنمو الفطر بدرجة حرارة 20 ± 2 ^{o}م و رقم هيدروجيني 7. و ان هناك فروقات معنوية في معدل النمو باختلاف مدة الحضن ،واعطى اليوم السابع من الحضن تفوقا معنويا عن اليوم الخامس ، واظهرت نتيجة التداخل بين نوع الوسط ومدة الحضن ،تفوق وسط CDA في اليوم الخامس ،بينما اعطى وسط PDA وCDA اعلى معدل لنمو الفطرواختلفت معنويا عن بقية الاوساط . و بينت نتائج التجربة ازدياد معدلات نمو الفطر *S. sclerotiorum* مع زيادة مدة الحضن ، إذ غطى الفطر مساحة الطبق بالكامل في اليوم السابع بالنسبة لوسط PDA و CDA ، ثم تباطأت معدلات النمو عند وسط OA إذ سجل معدل نمو 5.5 سم تلاه وسط SDA إذ لم يتجاوز قطر المستعمرة الفطرية 2.25 سم في نهاية مدة الحضن . تباين تأثير نوع الوسط الغذائي في نمو الفطر *S. sclerotiorum* ، و عادة تستمر الزيادة في معدل النمو مع إزدياد مدة الحضن عند توافر المواد الغذائية في الوسط المستخدم حتى نفاذ المواد الغذائية الضرورية للنمو . حيث لوحظ أن أفضل وسط لنمو الفطر كان في وسط CDA يليه وسط PDA ثم تباطأت معدلات النمو في وسط OA و وسط SDA ، قد يعود سبب النمو السريع للفطر الى توافر المتطلبات الغذائية في هذا الوسط و المتمثلة بنترات الصوديوم كمصدر نتروجيني و السكروز كمصدر كاربوني و فوسفات البوتاسيوم الثنائية كمصدر للفسفور (23، ؛ 24) ، كما أوضح(25) و (26)، أنّ افضل نمو للفطر *B. glaiolorum* و *S. rolfsii* كان في وسط CDA الحاوي على نترات البوتاسيوم كمصدر نتروجيني و الكلوكوز كمصدر كاربوني ، و قد اشار (27) الى ان المصدر الكاربوني الموجود في الوسط الغذائي يؤثر في معدل نمو الاحياء المجهرية الذي يتناسب طرديا مع التركيز المتوافر ضمن مستويات معينة . و قد جاءت هذه النتائج مقاربة لما ذكر(15) بأن وسط CDA هو احد الاوساط الجيدة لنمو الفطر *S. sclerotiorum* و في تحفيز الفطر على انتاج الاجسام الحجرية .

الجدول (1) تأثير نوع الوسط الغذائي و مدة الحضن و التداخل بينهما في قطر المستعمرة (سم) بدرجة حرارة 20 ± 2 ^{o}م.

نوع الوسط الغذائي	مدة الحضن(يوم)		معدل نوع الوسط الغذائي
	5	7	
PDA	2.2	8.5	5.35
CDA	4.77	8.5	6.63
OA	3.08	5.25	4.17
SDA	1.55	2.25	1.9
معدل مدة الحضن	2.9	6.13	
$L.S.D_{0.05}$	نوع الوسط الغذائي= 0.68 مدة الحضن= 0.48 التداخل = 0.96		

بينت نتائج التجربة في الجدول (2) ،ان اعلى نسبة لحامض الاوكزاليك 69.25% كان في الوسط SDA بعد سبعة ايام من الحضن بدرجة حرارة 20 ± 2 ^{o}م و رقم هيدروجيني 7 ، تلاه وسط CDA بنسبة 63.25% ، ثم انخفضت نسبة انتاج الحامض في الوسط PDA حيث و صلت النسبة الى 34.5% و كذلك انخفضت في الوسط OA و كانت النسبة 34.75% ، كما لم تسجل أي فروق معنوية بين الوسطين PDA و OA في النسبة المئوية لإنتاج حامض الاوكزاليك . قد يعزى سبب ارتفاع نسبة انتاج الحامض في وسط SDA الى وجود الدكستروز Dextrose كمصدر كاربوني و الببتون Peptone كمصدر نتروجيني و هذه النتيجة تتفق مع (18)، بأن وسط SDA هو الأفضل في انتاج مستويات عالية من حامض الأوكزاليك او الأوكزالات بواسطة الفطر *S. sclerotiorum* ، كما اشار الى ان الوسط الذي يسجل افضل مستوى من تراكم حامض الأوكزاليك او الاوكزالات ليس هو الوسط الذي يسجل افضل نمو لمستعمرة الفطر *S. sclerotiorum* ، و قد اكد (28) على ان انتاج حامض الاوكزاليك بمستويات مرتفعة لا يرتبط بنمو الغزل الفطري .

الجدول (2): تاثير نوع الوسط الغذائي في النسبة المئوية لإنتاج حامض الاوكزاليك Oxalic Acid في 25 مل من راشح الفطر *S. sclerotiorum* .

الوسط الغذائي	النسبة المئوية لحامض الأوكزاليك
PDA	**34.5**
CDA	**63.25**
OA	**34.75**
SDA	**69.25**
$L.S.D_{0.05}$	**0.276**

أظهرت النتائج في الجدول (3)، ان هناك فروقات معنوية بين الرقم الهيدروجيني 6.5 و 5.5 ، بينما لم تسجل فروقات معنوية بين الارقام الهيدروجينية الاخرى ، وان اعلى معدل للنمو سجل عند pH 7 والذي لم يختلف معنويا عنpH 7.5 ،كذلك هناك فروقات معنوية بين مدتي الحضن . اظهرت نتيجة التداخل ، إن الفطر *S. sclerotiorum* غطى مساحة الطبق بالكامل في اليوم السابع من الحضن إذ بلغ معدل النمو 8.5 سم عند الرقم الهيدروجيني 6 ، تلاه الرقم الهيدروجيني 7 إذ بلغ معدل النمو 8.16 سم ، اما عند pH 5.5 وفي اليوم السابع والذي لم يختلف معنويا عن pH 6.5، فأن نمو الفطر بطيئا إذ بلغ معدل النمو5.05و 6.18 سم على التوالي. و بالرغم من الزيادة المعنوية في معدلات النمو طوال مدة الحضن ، إذ لم يغط الفطر سوى 59% من مساحة الطبق في نهاية مدة الحضن .

ان التغير الحاصل في الرقم الهيدروجيني للوسط يؤثر في النشاط الفطري (27) ، فقد تتغير مستويات نمو الفطر بتغير مستوى الحموضة ، إذ كان الرقم الهيدروجيني 7 هو الامثل لنمو الفطر ، و هذه النتيجة لا تتفق مع (29) الذي بين أنّ الرقم الهيدروجيني 5 هو الامثل للنمو الخضري للفطر ، اما المدى الواسع من الارقام الهيدروجيني و التي مكنت الفطر من النمو فهي تتفق مع (13) الذي اوضح امكانية الفطر *S. sclerotiorum* على النمو في الارقام الهيدروجينية 3.5 – 7.5 ، كما ذكر (30) ،ان الفطر ينمو و ينتج اجسام حجرية في وسط فيه مدى من الارقام الهيدروجينية 2.5 – 9 . يمتاز سايتوبلازم الخلية الفطرية بكونه غير ناضح لأيونات الهيدروجين و الهيدروكسيل لذلك فأنه يمكن ان يبقى محافظا على نسبته من الأيونات الموجودة ، لكن الأنزيمات الموجودة في الغشاء السايتوبلازمي نفسه تتأثر بتركيز ايون الهيدروجين مما يؤدي الى تأثر الفعاليات الأخرى منها ألفة هذه الأنزيمات تجاه المواد المذابة في الوسط (27) . و أشار (31) الى ان انخفاض الرقم الهيدروجيني للوسط يجعل الغشاء السايتوبلازمي متمسكا بأيونات الهيدروجين إذ تعمل على عرقلة مرور الأيونات الموجبة ، أما عند إرتفاع الرقم الهيدروجيني فتعمل أيونات الهيدروجين على منع مرور الأيونات السالبة الضرورية .

الجدول (3) :تاثير pH الوسط و مدة الحضن و التداخل بينهما في قطر المستعمرة (سم) بدرجة حرارة 20 ± 2 ^{o}م .

pH	مدة الحضن(يوم)		معدل pH
	5	7	
5	2.88	7.66	5.27
5.5	1.65	5.05	3.35
6	2.45	8.5	5.47
6.5	3.3	6.18	4.74
7	3.76	8.16	5.96
7.5	3.76	7.58	5.67
معدل مدة الحضن	2.96	7.18	
$L.S.D_{0.05}$	pH = 1.224 مدة الحضن= 0.707 التداخل= 1.731		

بينت النتائج في الجدول (4) ،وجود فروق معنوية بين pH 7 و 7.5 في انتاج حامض الاوكزاليك، في حين لم تسجل فروق معنوية بين الارقام الهيدروجينية الاخرى . لقد كان pH 7 هو الافضل في نسبة انتاج حامض الاوكزاليك إذ بلغت 97.25% ، تلاه 7.5pH بنسبة 51% ، في حين انخفضت نسبة انتاج الحامض عند pH 5.5 و 6.0 إذ بلغت 47.5% ، الى 44.25% . هذه النتائج لا تتفق مع (10) الذي وجد اعلى كمية لانتاج الحامض عند الرقم الهيدروجيني. 4.5 بوجود الكلوكوز كمصدر كاربوني اضافة الى عناصر اخرى مثل Malate و Acetate . أشار(16) الى أنّ الرقم الهيدروجيني لوسط النمو يؤثر في تنظيم انتاج و تراكم الحامض في الفطر *S. sclerotiorum* ، كما بين ايضا بان انخفاض الرقم الهيدروجيني في الانسجة النباتية المصابة يحفز الفطر على انتاج الحامض لتوفير الظروف الملائمة لعمل الأنزيمات المحللة للجدار الخلوي النباتي ، و اوضح (28) ان الفطر *S. homoeocarpa* يتأثر في انتاجه لحامض الاوكزاليك بالرقم الهيدروجيني ، إذ يبدأ الفطر بإنتاج الحامض في و قت مبكر عند

الظروف البيئية المتجهة نحو القاعدية . ذكر (32) أنّ عدد من السكريات المتعددة و البسيطة تؤثر في انتاج و تنظيم الأوكزالات في الفطر *S. sclerotiorum* إذ تؤدي الى زيادة الرقم الهيدروجيني في الوسط و بالتالي زيادة تراكم الاوكزالات .

الجدول (4): تاثير pH في النسبة المئوية لإنتاج حامض الاوكزاليك Oxalic Acid في 25 مل من الفطر *S. sclerotiorum* .

pH	النسبة المئوية لحامض الأوكزاليك
5	47.5
5.5	44.25
6	44.25
6.5	47.5
7	97.25
7.5	51
$L.S.D_{0.05}$	0.188

المصادر:-

1)-Safavi, S. A. ; Farooq, A. S. ; Aziz, K. P. ; Reza, R. G. ; Ali, R. B. and Tariq, M. B. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entamopathogenic fungus *Beauvena bacissiana* FEMS , Microbiology letters , 270(1): 116 – 123 .

2)-Cochrane, v. w. (1958). Physiology of fungi , John Wiley & Sons , New York, pp. 524.

3)-Gao, Li. ; Man H Sun. ; Xing ZLiu & Yong C. S. (2007). Effect of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi , Mycol. Res., 111(1) : 87 – 92 .

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

5)-Marciano, P. ; Magro, P. & Favaron, F. (1989). *Sclerotinia sclerotiorum* growth and oxalic acid production on selected

6)-Maxwell, D. P. (1973). Oxalate formation in *Whetzelinia sclerotiorum* by oxaloacetate acetylhydrolase. Physiol. Mol. Plant Pathol. 3: 279 – 288.

7)-Vega, R. R. ; Corsini, D. & Le Tourneau, D . (1970). Nonvolatile Organic acids produced by *Sclerotinia sclerotiorum* in synthetic Liquid media. Mycologia 62: 332 – 338 .

8)-Rollins , J. A. & Dickman, M. B. (2001). pH signaling in *Sclerotinia Sclerotiorum* : identification of pacC/RIM1 homolog. Appl Environ . microbial . , 67: 75 – 81 .

9)-Bryan , J. Culbertson , B. J. ; Krone, J.Gatebe, E. ; Furumo, N. C. & Daniel , S. L. (2007). Impact of carbon sources on growth and Oxalate synthesis by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* . World J. Microbiol. Biotechnol. 23: 1357 – 1362.
culture media. FEMS Micobiology letters , 61: 57 – 69.

10)-Culbertson, B. J. ; Krone, J. ; Erastus, G. ; Furumo, N. C. & Steven, L. D. (2007). Impact of carbon sources on growth And oxalate synthesis by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum,* World J. Microbiol Biotechnol, 23: 1357- 1362.

11)-Lilly , V. G. & H. L. Barnett (1951). Physiology of the fungi, Mc Craw hill book Co., Inc. New York . pp. 464.

12)-Robbins , W. J. (1937). The Assimilation by plants of various forms of nitrogen , Amer. J. Bot., 24: 243- 250.

13)-Willetts, H. J. & Wong, J. A. L. (1980). The biology of *Sclerotinia sclerotiorum, S. trifoliorum,* and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature, The Botanical Review,46: 101 – 165.

14)-Zeliff, C. C. (1928). Studies of the effects of certain organic and in organic acids on *Sclerotinia sclerotiorum* , Trans.Amer. Microscop. Soc., 47: 468 – 473

15)-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(1): 89 – 95.

16)-Maxwell, D. P. & Lumsden, R. D. (1970). Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture, Phytopathology, 60: 1395 – 1398.
17)-Overell , B. T. (1952). Atoxin in culture filtrate of *Sclerotinia sclerotiorum* , Aust. J. Sci., 14: 197 – 198 .
18)-Mwangi, E. S. K. ; Gatebe, E. G. & Ndung'u, M. W. (2012).Impact of nutritional (C:N ratio and source) on growth, oxalate accumulation and culture pH by *Sclerotinia sclerotiorum*, Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 2(10): 2224– 3208.
19) -Tuite, J. (1969). Plant pathological methods: fungi and bacteria, Burgess Publishing Company Minneapolis, Minnesotta. pp. 239.
20)-Melo, I. S. ; Faull, J. L. & Nascimento, R. S. (2006). Antagonism of *Aspergillus terreus* to *Sclerotinia sclerotiorum*, Brazilian Journal of Microbiology, 37: 417 – 419.
21)-Bateman, D. F. & Beer, S. V. (1965)**.** Simultaneous production and Synergistic action of oxalic acid and poly galacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*, Phytopathology, 55: 204 – 211.
22)- Steel,R.G. and Torrie ,J.H.(1981). Principles and Procedures of Statistics .A Biometrical Approach.2nd edition.International Student Edition.
23)-Khanzada, S. A. ; Iqbal, S. M. & Haqqani, A. M. (2003). Physiological studies on *Macrophomina phaseolina*, Mycopath., 1: 4 – 31.
24)-Farooq, S. S. ; Iqbal, M. & Abdul Rayf, C. (2005). Physiological studies on *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceri, Journal of Agriculture & Biology, 7: 275 – 277.
25)-Tariq, M. ; Mirza, J. H. & Shakir, A. B. (1993). Physiological studies of *Botrytis gladiolorum* and its in vitro sensitivity to fungicides, Pakistan J. Phytopathol., 5: 89 – 92.
26)-Hussain, A. ; Iqbal, S. M. , Ayub, N. & Haqqani, A. M. (2003). Physiological studies of *Sclerotium rolfsii* , Pakistan J. Plant Pathol., 2: 6 – 102.
27)-السعد ، مها رؤوف (1990). فسلجة الاحياء المجهرية . الطبعة الثانية . جامعة بغداد ، بغداد.
28)-Beaulieu, R. A. (2008). Oxalic acid production by sclerotinia Homoeocarpa: the causal agent of dollar spot, the under graduate colleges of the Ohio state university, S. H. Thesis.
29)-Cuong, D. C. & Dohroo, N. P. (2006). Morphological, cultural and Physiological studies on *Sclerotinia sclerotiorum* causing stalk Rot of cauliflower, omonrice, 14: 71 – 77.
30)-Marukawa, S. ; Funakawa, S. & Satomura, X. (1975). some physical and chemical factors on formation of sclerotia in *Sclerotinia libertina* Fuckel, Agric. Biol. Chem. 39: 463 – 468.
31)-Shresti, R. A. Y. (2005). Studies on collar rot complex of *Coleus forskohlii* (wild.) Briq. M. Sc. Thesis. University of Agricultural Sciences . Collage of Agriculture, Dharwad. pp. 100.
32)-Daniel, S. L. ; Culbertson, B. J. & Furumo, N. C. (2007). Impact of nutritional supplements and monosacchrides on growth, oxalate accumulation, and culture pH by *Sclerotinia sclerotiorum*, FEMS Microbiology Letters, 270(1): 132 – 138.