# تقييم فعالية البكتريا *Azotobacter chroococcum* والفطر *Trichoderma* spp. في مكافحة مرض خناق بادرات القطن المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* Kühn

**عهد عبدعلي هادي مطلوب  فنن عارف عبدالله الكيم**

الكلية التقنية المسيب –جامعة الفرات الاوسط التقنية

Sport_colege2011@yahoo.com

## الخلاصة

هدفت الدراسة الى مسح مرض خناق بادرات القطن في بعض مناطق محافظة بابل وعزل المسبب الرئيس للمرض وتشخيصه وتقويم فاعلية البكتريا *Azotobacter chroococcum* والفطر *Trichoderma* spp. ضد الممرض تحت الظروف المختبرية و الظلة الخشبية. بينت نتائج المسح الحقلي الذي اجري في 10 حقول تابعة لمحافظة بابل انتشار مرض خناق بادرات القطن في جميع المناطق التي شملها المسح وبنسبة إصابة تراوحت 80–100% وشدة إصابة 40–86%. وأظهرت نتائج العزل والتشخيص أن الفطر *Rhizoctonia solani* موجود في جميع عينات المناطق التي شملها المسح. وكشفت نتائج الفحص المجهري لأطراف الخيوط الفطرية الحديثة لعزلات الفطر *R. solani* (Rs1–Rs10) أن عدد الانوية الظاهرة بلون ازرق غامق تراوح ما بين ثلاث الى تسع انويه مما يشير إلى أن هذه العزلات هي من نوع Multinucleate. أظهرت النتائج أن جميع العزلات كانت ممرضة وخفضت النسبة المئوية لإنبات بذور الفجل وبنسبة إصابة مابين 5.33–100% . كما وأوضحت النتائج أن جميع العزلات المختبرة كانت ممرضة لنباتات القطن واثرت سلبا في انبات بذور القطن تحت ظروف الظلة الخشبية. حققت عزلة البكتريا *A. chroococcum* (A1) نسبة تثبيط بلغت 100% ضد الفطر *R. solani* (Rs6) على وسط PSA . و أحدثت جميع التخافيف المستعملة من البكتريا ($10^{-1}$ – $10^{-6}$) معنويا في النسبة المئوية لتثبيط نمو الفطر الممرض وكلما كان تركيز البكتريا اكبر كلما ازدادت النسبة المئوية لتثبيط الفطر *R. solani* . وحقق الفطرين *Trichoderma harzianum* و *T. viride* مقدرة تضادية عالية ضد الفطر الممرض *R. solani* (Rs6) على وسط الزرعي PSA. و حققت معاملة التداخل بين الفطر *T. harzianum* والبكتريا *A. chroococcum* ومعاملة التداخل بين الفطر *T. viride* والبكتريا أعلى نسبة خفض في النسبة المئوية للإصابة بمرض خناق القطن وشدتها بلغت 6.67، 6.67، 1.33 و 2.67% على التوالي، قياسا بمعاملة الفطر الممرض بمفرده إذ بلغت نسبة و شدة الإصابة فيها 100% تحت ظروف الظلة الخشبية، وقد أدت جميع المعاملات إلى توفير حماية جيدة لبذور وبادرات القطن و رفع معنوي في معايير نمو بادرات القطن المدروسة.

**الكلمات المفتاحية:** مرض الخناق، القطن، فطر، البكتريا، الاصابة ، التثبيط.

## Abstract

The study aimed to survey the sore skin disease on cotton seedling in some areas of Babylon province and isolate the main causative of this disease and diagnosis it, and to evaluate the efficacy of the bacteria *Azotobacter chroococcum* and the fungus *Trichoderma harzianum* and *T. viride* against pathogen under Laboratory and lath house conditions. The results of field survey, was conducted in 10 fields subsidiary to Babylon province showed that sore skin disease on cotton seedling was spread in all areas that survey is covered, in disease incidence and severity was 80-100% and 40-86% respectively. The results of isolation and identification showed that *Rhizoctonia solani* fungus was presented in all infected plants and all new growth hyphae of *R. solani* isolates Rs1-Rs10 were multinucleate. The results showed that all isolates were virulence and had differences in their pathogenicity through inhibition of Radish seed germination and disease incidence ranged between 5.33-100%, Also the results appeared that all tested isolates were virulence on cotton plants and negatively affected in cotton seeds germination under lath house conditions. the *A. chroococcum* (A1) isolate caused inhibition in *R. solani* (Rs6) growth which was 100% on PSA medium. All dilutions *A. chroococcum* ($10^{-1}$-$10^{-6}$) increase in inhibition ratio of pathogen. The results of laboratory experiments appeared that the fungus *Trichoderma harzianum* and *T. viride* had high ability to inhibit the growth of pathogenic fungus *R. solani* (Rs6). the interaction treatments of the bacteria *A. chroococcum* with *T. harzianum* fungus and the bacteria *A. chroococcum* with *T. viride* fungus in disease incidence and severity of sorewas 6.67, 6.67, 1,33 and 2.67% respectively of sore skin disease, comparing with pathogenic fungus alone which was 100% under lath house conditions, also all used treatments showed high percentage in seed germination and growth parameters of cotton seedling.

**Key words**: sor skin disease, cotton, Fungus, Bacteria, infection, inhibition

**المقدمة**

يعد محصول القطن .*Gossypium hirsutum* L الذي ينتمي إلى العائلة الخبازية ( Malvaeceae) أحد أهم محاصيل الألياف عالميا ويأتي في مقدمة المحاصيل الصناعية الصيفية في العراق، إذ تستعمل اليافه في صناعة الغزل والنسيج والمفروشات وصناعة الورق، ويستخرج الزيت من بذوره لأغراض الطعام وصناعة الصابون فضلا عن استخدام كسبة بذوره في تغذية الحيوانات (الجبوري واخرون،2011 و Khedri واخرون، 2014)، وقد بلغت المساحة المزروعة به في العراق 65.5 ألف دونم، وبمعدل عام للإنتاجية 26.6 الف طن (الجهاز المركزي للاحصاء، 2012). يتعرض القطن للإصابة بالعديد من الأمراض ويعد مرض خناق بادرات القطن واحدا من اخطر الأمراض على هذا المحصول إذ يترتب عليه الترقيع فضلا عن ضياع الموعد الملائم للزراعة، مما يعرض المحصول لمختلف الآفات الزراعية وعدم التجانس في النمو والنضج

(جبر والربيعي، 2008 و Rothrock، 2015). يتسبب مرض خناق القطن نتيجة الإصابة بالفطر *Rhizoctonia solani* kuhn وهو من أكثر الفطريات انتشارا وخطورة على المحصول (Ardekan واخرون، 2009 و Sharon، 2010) إذ يسبب الفطر تعفن البذور وموت البادرات قبل البزوغ وبعده وتعفن الجذور وظهور تقرحات داكنة اللون عند قاعدة الساق للبادرات المصابة، أما النباتات المصابة فإنها تكون ضعيفة، ذات جذور مضمحلة حساسة للجفاف والظروف البيئية الأخرى مما يؤدي إلى ضعفها وبطيء نموها وبالتالي قلة الإنتاجية (Kennett، 2009 و Omar وآخرون، 2009). استخدمت طرائق مكافحة مختلفة لتقليل الخسائر التي يسببها هذا الفطر كالدورات الزراعية وتبوير الأرض والغمر، إلا أنها لم تعط النتائج المطلوبة بسبب سعة المدى العائلي لهذا الفطر وقابليته على الترمم فضلا عن قابليته على البقاء ساكنا لعدة سنوات في التربة بهيئة اجسام حجرية (Alabouvette، 2000 و جبر و الربيعي، 2008 و مطلوب، 2014)، و استخدمت المكافحة الكيميائية بشكل واسع في القضاء على فطريات التربة الممرضة (Koenning، 2001)، إلا أنها لا تنسجم مع التوجهات الحديثة في العالم لما لها من آثار سلبية على البيئة وصحة الإنسان والحيوان (Den hond وآخرون، 2003) فضلا عن ظهور حالات المقاومة في العديد من الفطريات لفعل عدد كبير من المبيدات (Taylor وآخرون، 2002). اتبعت في العقود الأخيرة المكافحة الإحيائية بأستعمال بعض الأحياء المضادة التي تعمل على كبح الممرضات النباتية وكذلك تعمل في الوقت نفسه على زيادة الإنتاج ومن ابرز هذه الأحياء مجموعة من البكتريا التي تسمى البكتريا المشجعة لنمو النبات Plant Growth Promoting Rhizobacteria مثل البكتريا *Azotobacter chrococcum* (Larkin، 2004 و Gomathinayagam وآخرون، 2012)، و نال استعمال الفطر .*Trichoderma* spp اهتمام العديد من الباحثين في مجال مكافحة الامراض النباتية والذي نجح كبديل للمبيدات الكيميائية ( Mansoori وآخرون، 2013). وتعزى التأثيرات الايجابية لهذه الكائنات تجاه النبات لما تمتلكه هذه الأحياء من خصائص مميزة متمثلة بالفعل التثبيطي أو التنافسي لمسببات الأمراض وتحفيز نمو ودفاعات العائل النباتي وغيرها من الآليات التي دفعت الكثير من الباحثين للاهتمام بدراستها وتطويرها (Benuzzi وآخرون 2004 و Kaewchai وآخرون، 2009). ولاهمية مرض خناق بادرات القطن وقلة الدراسات التشخيصية ولمحاولة ايجاد طرق مكافحة حيوية صديقة للبيئة هدفت الدراسة الى:

١- مسح مرض خناق بادرات القطن في بعض حقول محافظة بابل.

٢- عزل وتشخيص الفطر *R. solani* واختبار مقدرته الامراضية.

٣- اختبار فاعلية البكتريا الحيوية *Azotobacter chroococcum* و الفطر *Trichoderma harzianum* و *T. viride* ضد الفطر الممرض *R. solani* تحت الظروف المختبرية و الظلة الخشبية.

**المواد وطرائق العمل**

**1- المسح الحقلي لمرض خناق بادرات القطن في بعض مناطق محافظة بابل**

أجري مسح حقلي لمرض خناق بادرات القطن في بعض مناطق محافظة بابـــل (العزاوية، جبلة، المنصوري، مويلحة، أبو الجاسم، الجيلاوية، المحاويل، البدعة، مشروع المسيب، الوطيفية) للموسم الزراعي 2013 ( عمر النباتات ٣-٤ اسبوع) وقد تراوحت مساحة الحقول بين 1-4 دونم جمعت عينات من نباتات القطن المزروعة وبصورة عشوائية بقلع النباتات باحتراس ووضعها في أكياس بولي اثلين مع تسجيل مكان وتاريخ جمع العينة والمساحة وموعد الزراعة، و تم حساب النسبة المئوية للإصابة وشدة الإصابة للمجموع الجذري وفقاً للدليل المرضي المكون من 6 درجات (صورة 1) كما يأتي: 0 = نباتات سليمة. 1= تعفن الجذور الثانوية. 2 = تعفن الجذور الثانوية وجزء من الجذر الرئيسي.3= تعفن الجذور الثانوية والجذر الرئيسي دون تعفن قاعدة الساق. 4= تعفن الجذر الرئيسي وتهرؤه وتعفن قاعدة الساق. 5= موت النبات. وتم حساب النسبة المئوية للاصابة حسب المعادلة التالية:

**%للاصابة = (عدد النباتات المصابة / العدد الكلي للنباتات المفحوصة) × 100**

وقد حسبت النسبة المئوية لشدة الإصابة حسب معادلة Mckinney (1923) وكما يأتي:

**( عدد النباتات في ( عدد النباتات في ( عدد النباتات في**

**الدرجة 0 × 0) + الدرجة 1×1 ) +. .. + الدرجة 5×5 )**

**% لشدة الإصابة =**

---

---

---

**100× ــــــــ**

**مجموع النباتات المفحوصة × 5**

**٢- عزل وتشخيص الفطر *Rhizoctonia solani* من نباتات القطن المصابة**

جلبت نباتات القطن التي ظهرت عليها أعراض الإصابة المتمثلة بالذبول والاصفرار وتعفن الجذور وتقرح قواعد السيقان وتخصرها إلى المختبر وأخذت قطع من الجذور وقواعد السيقان التي ظهرت عليها أعراض التعفن والتقرحات ( صورة ١) وغسلت بالماء الجاري لمدة 30 دقيقة وقطعت إلى أجزاء صغيرة بطول 0.5 سم وعقمت سطحياً بمـــــحلول هايبوكلورات الصوديوم (0.5% كلور حر) لمدة 3 دقائق بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم لمدة 2 دقيقة ونشفت بورق الترشيح المعقم ونقلت بواسطة ملقط معقم وزرعت بواقع 4 قطع / طبق بتري قطر 9 سم حاو على 15-20 سم$^3$ من الوسط الزرعي اكر السكروز والبطاطا Potato Sucrose Agar (PSA) (200 غم بطاطا ،10 غم سكروز ،20 غم اكر، لتر ماء مقطر) المـــــضاف إليه المـــــضاد الحيوي Tetracycline بتركيز 200 ملغم / لتر وذلك بعد تعقيم الوسط بجهاز المؤصدة ( 121 م° وضغط 1.5 كغم/سم$^2$) لمدة 15 دقيقة، حضنت الأطـــــباق في 25±1 م° لمدة يومين وبعدها أجري الفحص لنموات

الفطـــر *R. solani* وتنقيتها بنقل قطع صغيرة من أطراف الخيوط الفطرية ووضعها فـــي مركـــز طبـــق بتـــري حاوٍ علـــى الوســـط الزرعـــي PSA، وحضنت الأطباق على درجة حرارة 25 ± 1 م ْلمدة 4 ايام بعدها حفظت العزلات في أنابيب اختبار حاوية على الوســـط الزرعـــي Potato Carrot Agar (PCA) (20غم بطاطا، 20غم جزر، 20غم اكر،1 لتر ماء مقطر) جرى تعقيمه بجهاز المؤصدة ( 121 م° وضغط 1.5 كغم/سم$^2$) ولمدة 20 دقيقة، وضعت الأنابيب بصورة مائلة لحين التصلب، ولقحت الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي باضافة قرص بقطر0.5 سم من عزلات الفطر *R. solani*، وضعت انابيب الاختبار في الحاضنة عند درجة حرارة 25 ± 1 م ْ لمدة سبعة ايام بعدها نقلت الى الثلاجة عند درجة حرارة 4 م ْ، شخص الفطر اعتمادا على الصفات المزرعية والمجهرية المذكورة في (Parmeter وWhitney، 1970 ). استعملت طريقة Herr ( 1979) في تصبيغ نوى الفطر *R. solani* وتحديد عددها، اذ نميت العزلات النقية في طبق بتري حاوي على الوسط الزرعي PSA وبعمر 3 ايام، استخدمت صبغة Aniline blue لتصبيغ نوى الفطر *R. solani*، اذ حضر محلول يتكون من 1 مل من مادة Tween 20 و 1 مل من Lactic acid تركيز 85 % في 1 لتر ماء مقطر معقم. أضيفت بضعة قطرات من المحلول ونشرت بعناية في منطقة محددة من مستعمرة الفطر *R. solani* وأضيفت قطرة واحـــدة من صبغة Aniline blue تركيز 0.5 % للمنطقة المعاملة ووضع غطاء الشريحة فوق المنطقة المعاملة. وبـــعد 30 دقيقة فحصت المنطقة تحت المجهر وقدرت عدد الانوية في الخيوط الفطرية التي تظهر بلون ازرق غامق.

**صورة ١. أعراض التعفن والتقرحات على البذور والجذور وقواعد السيقان لنباتات القطن**

## ٣. أخـــتبارات الـــمـــقدرة الأمـــراضـــية

### 3-1. الكشف عن العزلات الممرضة للفطر *Rhizoctonia solani* بأستعمال بذور الفجل

اختبرت المقدرة الامراضية لجميع عزلات الفطر *R. solani* (10 عزلات)، وذلك بحســـب طريقـــة Bolkan و Butler (1974) وباستعمال بذور الفجل المحلي. حيث حضرت أطباق بتري قطر9 سم حاوية على الوسط الزرعي الأكـــر والمـــاء Water Agar (20 غم أكر ، 1 لتر ماء مقطر) المعقـــم بجهاز المؤصـــده (121 مْ و 1.5 كغم / سم$^2$ ولمدة 15 دقيقة) والمضاف اليه المضاد الحيوي Tetracycline وبعد تصلب الوسط لقحت الأطباق في مركزها بقرص قطر(0.5 سم) من مزارع عزلات الفطـــر *R. solani*

المـنماة على الوسط الزرعي PSA بعمر 5 أيام كل على انفراد ثم حضنت الأطباق على درجة حرارة 25 ± 1 مْ لمدة 3 أيام وبعد ذلك زرعت بذور فجل محليـة (نسبة انباتها 100%) معقمة سطحياً بمحلول هايبوكلورايد الصوديوم وضعت بصورة دائرية قرب حافة الطبق وبمعدل 25 بذرة لكل طبق. أستعملـت 3 أطباق لكل عزلة كمكررات فضلا عن معاملة المقارنة من دون فطر، حضنت الأطباق مرة أخرى على الدرجة الحرارية نفسها وأخذت النتائج بعـد 7 أيام مـن الزراعة بحساب نسبة الإنبات حسب المعادلـة الآتيـــــــــة :

**النسبة المئوية للإنبات = عدد البذور النابتة / العدد الكلي للبذور× 100**

**3-2. تأثير بعض العزلات الممرضة للفطر *Rhizoctonia solani* على بذور وبادرات القطن**

انتخبت بعض العزلات متباينة الامراضية من الفطر *R. solani* (Rs2، Rs4، Rs5، Rs6، Rs7) وأضيف لقاح الفطر المحمل على بذور الدخن المحلي وبنسبة 1% ( وزن / وزن) إلى ترب مزيجية معقمة بجهاز المؤصدة (121 مْ و 1.5 كغم / سم$^2$ ولمدة نصف ساعة، وأعيد تعقيمها في الظروف نفسها في اليوم التالي) والموزعة في أصص بلاستيكية سعة 1 كغم زرع بكل اصيص عشرة بـذور قطن محلية معقمة سطحياً بمحلول هايبوكلورات الصوديوم، كررت كل معاملة 3 مرات و تركت 3 مكررات من دون إضافة الفطر الممرض كمقارنة وضعت الاصص في الظلة الخشبية وسقيت كلما دعت الحاجة لذلك ومع اكتمال بزوغ البادرات في معاملة المقارنة بعد 5 ايام حسبت النسبة المئوية للإنبات.

**٤. عزل بكتريا *Azotobacter* من التربة وتنقيتها**

عزلت البكتريا *Azotobacter* بتحضير تخافيف لعينات التربة التي جمعت من منطقة حول الجذور لنباتات الحنطة والشعير (محافظة بابل) وذلك بإضافة 10 غم من عينات التربة المختارة الى 90 مل من الماء المقطر المعقم في دوارق سعة 250 مل ومزجت جيداً و أجريت تخافيف متسلسلة والى حد $10^{-6}$ وذلك بنقل 1 مل من عالق التربة إلى أنابيب اختبار تحتوي 9 مل من الماء المقطر المعقم لكل عينة من عينات التربة، اخذ 1 مل من تخافيف التربة المحضرة أعلاه بواسطة ماصة معقمة لتلقيح أنابيب اختبار تحتوي على9 مل من الوسط الزرعي السائل Sucrose Mineral Salts (SMS) الذي يتكون ممايأتي:

| المـــــــادة | الكمية(غم.لتر$^{-1}$) | المـــــــادة | الكمية(غم.لتر$^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| Sucrose | 10,0 | $FeSO_4.7H_2O$ | 0.02 |
| $CaCO_3$ | 3.0 | $MnSO_4.H_2O$ | 0.02 |
| $K_2HPO_4$ | 0.5 | $MoO_3$ | 0.01 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.2 | KI | 0.01 |
| $CaSO_4$ | 0.1 | $H_2O$ | 1000مل |

* تعدل الحموضة الى 7.2-7.3. * لتحضير الوسط الصلب يضاف له الاكر بنسبة2%.

والذي حضر وعقم بجهاز المؤصدة واستعملت 3 مكررات لكل تخفيف، ثم حضنت الأنابيب في حرارة 28 مْ ولمدة 2-3 أيام وفحصت الأنابيب بملاحظة الغشاء البني المتكون على السطح والذي يعد مؤشراً لنمو بكتريا *Azotobacter*. ثم اخذ لقاح (بواسطة الإبرة ذات العقدة المعقمة) من الأنابيب التي أعطت مؤشراً للنمو ونشرت على سطح طبق بتري يحتوي على الوسط الصلبSucrose Mineral Saslt Agar (SMSA)

وحضنت الأطباق في درجة حرارة 28±1 م° ولمدة 3 أيام، ثم أعيد التخطيط على وسط غذائي جديد لثلاث مرات متتالية للحصول على مستعمرات نقية. حفظت العزلات في أنابيب الاكر المائل (Slant) من الوسط Sucrose Mineral Saslt Agar (SMSA) وحضنت لمدة يوم واحد ثم نقلت إلى الثلاجة بدرجة حرارة 4 مْ ونشطت العزلات باستعمال وسط التنشيط الخاص (Thompson و Skerman، 1979) الذي يتكون ممايأتي:

| المـــــــادة | الكمية(غم.لتر$^{-1}$) | المـــــــادة | الكمية(غم.لتر$^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| $K_2HPO_4$ | 0.3 | $NaMoO_4.2H_2O$ | 0.005 |
| $KH_2PO_4$ | 0.7 | Sucrose | 20.0 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.2 | Yeast extract | 5.0 |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.1 | $H_2O$ | 1000مل |
| $FeSO_4.9H_2O$ | 0.05 | | |

* تعدل الحموضة (pH) الى 7.3. * لتحضير الوسط الصلب يضاف الاكر بنسبة 2%.

## ٥. تشخيص نوع البكتريا *Azotobacter chroococcum*

### ٥-١. تحديد الصفات المزرعية

سجلت الصفات المظهرية للمستعمرات النامية على الوســـط التخصصـــي الصلب SMSA والتي تضمنت كثافة وشكل النمو ولون المستعمرة ومدى مقدرتها على إفراز مواد لزجة وصبغات بتقدم عمر المزرعة (Black ، 1965).

### 5-2. تحديد الصفات المجهرية

اجري الفحص المجهري للبكتريا وذلك بعد تصبيغها بصبغة كَرام والتي حضرت على وفق ما جاء به Buxton و Fraser (1977) وتمت ملاحظة شكلها ، وحجمها ، وطريقة تجمعها ، وقابليتها على الاصطباغ (Black ، 1965).

### 5-3. الاختبارات الكيموحيوية

**1. اختبار كفاءة العزلات على تثبيت النتروجين الجوي**

حضرت بيئات سائلة خالية من النتروجين، إذ وضع 50 مل من البيئة السائلة في دوارق زجاجية سعة 250 مل وأضيف لكل منها 1% Mannitol ولقحت الدوارق بإضافة 1 مل من المزرعة السائلة للعزلات المختلفة وحضنت لمدة 3 أسابيع في درجة حرارة 28 م° وقدرت كمية الأمونيا المتكونة في البيئة بأخذ 5 مل منها وتقديره بجهاز Microkildahl (Bremner ، 1965).

**2. اختبار استهلاك المصادر الكاربونية المختلفة**

اختبرت مـــــــقدرة العـــــــزلات على الاستفادة من المصادر الكاربوهيدراتية التي اشتملت على المانيتول والكلوكوز والسكروز والنشا كمصادر كاربونية اذ اضيفت بصورة منفصلة الى وسط Walksman No 77 (

بيئة سائلة خالية من النتروجين) بنسبة 1% (وزن/حجم) ثم حضنت على درجة 28 م° ولمدة ثلاثة ايام حسبما ذكر في Shankarappa و Madhav Rao (1998 ). ويتركب الوسط الخالي من النتروجين من:

| المـــــــــادة | الكمية( غم. لتر$^{-1}$) | المـــــــــادة | الكمية(غم.لتر$^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| $K_2HPO_4$ | 0.5 | $MnSO_4.4H_2O$ | 0.02 |
| $MgSO_4$ | 0.2 | $FeCl_3.6H_2O$ | 0.02 |
| NaCl | 0.2 | $H_2O$ | 1000مل |

* تعدل الحموضة الى 7.2 – 7.3 *للحصول على الوسط الصلب يضاف الاكر بنسبة 2%.

**3. النمو في 1% كلوريد الصوديوم في الوسط السائل والصلب**

نميت عزلات البكتريا في الوسط الزرعي SMS السائل والصلب بعد اضافة 1% من كلوريد الصوديوم له والتحضين لمدة 3–4 ايام وبدرجة حرارة 28 م°، ويعد ظهور العكرة على الوسط السائل وظهور المستعمرات على الوسط الصلب دليلاً على مقدرة البكتريا على النمو (Tchan و Peter، 1984).

**4. اختبار النمو في وسط بيرك (Burk's medium)**

ويستعمل هذا الوسط للتمييز بين انواع البكتريا *Azotobacter* إذ استعمل فيه 10 غم/ لتر من بنزوات الصوديوم بدلاً من السكروز (Allen، 1959) ويتركب الوسط مما يأتي :

| المـــــــــادة | الكمية(غم. لتر$^{-1}$) | المـــــــــادة | الكمية(غم.لتر$^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| $K_2HPO_4$ | 0.8 | $FeSO_4.9H_2O$ | 0.01 |
| $KH_2PO_4$ | 0.2 | $NaMoO_4.2H_2O$ | 0.01 |
| NaCl | 0.2 | Agar | 20.0 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.2 | Sodium benzoate | 10.0 |
| $CaSO_4.2H_2O$ | 0.1 | $H_2O$ | 1000 مل |

* تعدل الحموضة الى7.2–7.3.

**5. النمو في درجة حرارة 37 م°**

اختبرت قابلية نمو عزلات البكتريا في الوسط الزرعي الصلب SMSA لمدة 3–4 أيام بدرجة حرارة 37 م° ويعد ظهور المستعمرات في الوسط الصلب فحصاً موجباً للاختبار (Thompson و Skerman ، 1979).

**6. اختبار حـــــركة البكتريا *Azotobacter chroococcum***

اجري اختبار مقدرة البكتريا على الحركة بعد تنميتها في الوسط السائل SMS لمدة يوم واحد وباستعمال طريقة القطرة المعلقة (Hanging Drop) ، (Black، 1965).

**7. حساب أعداد البكتريا *Azotobacter chroococcum***

اتبعت طـــــريقة عـــــد المستعمرات المـــــباشر فـــي الأطباق (The Plate Count Technique) لحـــــساب العدد الكلي للبكـــــتريا *A. chroococcum*. حضرت التخافيف $10^{-1}$ – $10^{-6}$ بنقل 1 مل مـــــن مـــزرعة البكتيريا المنماة على وسط التنشيط السائل وبعمر 3 أيام إلى سلسلة أنابيب ماء مقطر معقم باستعمال ماصة ميكانيكية دقيقة مـــــعقمة. نقل 1 مل ابتداءً مـــــن التخفيف الرابع الى طبق بتري حاوي على الوسط SMSA مع تحريك الطبق حركة رحوية حضنت الاطباق ( 28±1م°) لمدة 3 أيام، ثم حسب

عدد الخلايا البكتيرية كالآتي: عدد البكتيريا/ مل من العينة الأصلية=عدد المستعمرات في الطبق × مقلوب تخفيف العينة (الحديثي، 1983).

**٦. تحضير لقاح البكتيريا *Azotobacter chroococcum***

لتحضير كمية من اللقاح البكتيري و أستعماله في التجارب المختبرية وتجارب الظلة الخشبية والحقل نميت البكتريا على وسط التنشيط السائل بوضع 50 مل من هذا الوسط في دورق زجاجي حجم 100مل ولقح بالبكتريا المأخوذة من مزرعة بعمر يوم واحد وللحصول على كمية اكبر من اللقاح لتجارب البيت الزجاجي والحقل استعملت دوارق مخروطية حجم 250 مل تحتوي على 100مل من وسط التنشيط السائل المعقم وحضنت الدوارق الملقحة في حاضنة (28±1م°) ولمدة 3–5 أيام.

**7. اختبار المقدرة التضادية للبكتريا *Azotobacter chroococcum* في تثبيط نمو الفطر *Rhizoctonia solani* على وسط PSA**

اختبرت القابلية التضادية لعزلات البكتريا *A. chroococcum* (A1 (حنطة–العزاوية)، A2 (شعير–الوطيفية)، A3(حنطة–الوطيفية)) ضد الفطر الممرض *R. solani* (Rs6) على الوسط الزرعي PSA بإضافة 1 مل من عالق كل عزلة من العزلات البكتيرية المنماة على وسط التنشيط السائل عمر 5 أيام في طبق بتري حاو على الوسط الزرعي PSA مع تحريك الطبق حركة رحوية لتوزيع اللقاح بصورة متجانسة. ثم وضع قرص قطر 0.5 سم من مزرعة الفطر الممرض عمر 7 في مركز الطبق ، استعملت 3 اطباق للمعاملة وتركت 3 أطباق من دون إضافة البكتريا كمقارنة، حضنت الأطباق (25±1 م°) لمدة 7 أيام، وتم حساب معدل نمو الفطر الممرض والنسبة المئوية للتثبيط على وفق المعادلة المذكورة في الفقرة 3–10.

**8. تحديد التخفيف الفعال من لقاح البكتريا *Azotobacter chroococcum* المثبط لنمو الفطر *Rhizoctonia solani***

حضرت عشرة انابيب اختبار تحتوي كل انبوبة 9 مل ماء مقطر معقم وتم اخذ 1 مل من عالق البكتريا (A1) وأضيف إلى الأنبوبة الأولى بواسطة ماصة معقمة ومزجت المكونات بتحريك الأنبوبة باليد ثم اخذ 1 مل من الأنبوبة الأولى بواسطة ماصة معقمة اخرى واضيف الى الانبوبة الثانية ومزجت المكونات جدا وكررت العملية على باقي انابيب الاختبار للحصول على سلسلة من التخافيف $10^{-1}$ – $10^{-6}$ بعدها جرى تلقيح أطباق حاوية على PSA (من دون اضافة مضاد حيوي) باخذ 1 مل / طبق من كل تخفيف من العالق البكتيري بواسطة ماصة معقمة ووضع في مركز الطبق وحرك حركة رحوية لتوزيع اللقاح، حضنت الأطباق بدرجة حرارة (28±1م°) لحين وصول مستعمرة الفطر في معاملة المقارنة الى حافة الطبق بعد ذلك تم حساب النسبة المئوية لتثبيط النمو الفطري حسب المعادلة اللآتية :

**%للتثبيط =( نمو الفطر في معاملة المقارنة– النمو في المعاملة/ نمو الفطر في معاملة المقارنة) × 100**

**٩. اختبار المقدرة التضادية للفطر *Trichoderma harzianum* والفطر *Trichoderma viride* في تثبيط نمو الفطر الممرض *Rhizoctonia solani* على وسط PSA**

اختبرت المقدرة التضادية لعزلة الفطر *T. harzianum* التي تم الحصول عليها من الكلية التقنية/المسيب–قسم تقنيات المقاومة الاحيائية وعزلة الفطر *T. viride* من أ.د. كامل سلمان جبر (كلية الزراعة/جامعة بغداد) ضد عزلة الفطر الممرض *R. solani* (Rs6) حسب طريقة الزرع المزدوج إذ قسم

طبق بتري قطره 9سم حاوي على الوسط الزرعي PSA بخط وهمي إلى قسمين متساويين ، ولقح مركز القسم الأول من الطبق بقرص 5 ملم من مستعمرة الفطر الممرض بعمر 7 ايام ، بينما لقح القسم الأخر من الطبق بقرص مماثل من مزرعة الفطر *T. harzianum* والفطر *T. viride* كل على حدة كررت كل معاملة ثلاث مرات. وضعت الأطباق في حاضنة (25±1 م°) لمدة أسبوع واحد ولتقدير المقدرة التضادية اتبع مقياس معتمد (Bell واخرون، 1982) مكون من خمس درجات وكما يلي : 1- العامل الأحيائي *T. harzianum* يغطي كامل مساحة الطبق دون السماح للفطر الممرض بالنمو. 2- العامل الأحيائي يغطي ثلثي مساحة الطبق، ويغطي الفطر الممرض الثلث الباقي.

3- العامل الأحيائي يغطي نصف مساحة الطبق و الفطر الممرض يغطي النصف الأخر من الطبق. 4 - العامل الأحيائي يغطي ثلث مساحة الطبق، بينما يغطي الفطر الممرض الثلثين المتبقيين من الطبق. 5- يغطي الفطر الممرض الطبق دون السماح للعامل الأحيائي بالنمو. ويعد عامل المكافحة الإحيائية فعالاً من الناحية التضادية عند إظهار درجة تضاد 1 أو 2 مع الفطر الممرض.

**١٠. تقويم كفاءة بعض العوامل الاحيائية في خفض نسبة الإصابة بمرض خناق بادرات القطن المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* تحت ظروف الظلة الخشبية**

أجريت هذه التجربة في الظلة الخشبية / المعهد التقني المسيب بتاريخ 15 / 9/ 2013 باستخدام اصص بقطر 25 سم وسعة 2 كغم حاوية على تربة معقمة بجهاز المؤصدة في درجة حرارة 121 م° وضغط 1.5 جو ولمدة نصف ساعة وليومين متتاليين وتركت 7 أيام قبل الاستعمال. تضمنت التجربة المعاملات الاتية :1- الفطر *R. solani* (Rs6) بمفرده 2- الفطر *R. solani* (Rs6) + البكتريا 3-*A. chroococcum* الفطر *R. solani* (Rs6) + الفطر 4-*T. viride* الفطر *R. solani* (Rs6) + الفطر *T. harzianum* ٥- الفطر *R. solani* (Rs6) + البكتريا *A. chroococcum* + الفطر *T. viride* ٦- الفطر *R. solani* (Rs6) + البكتريا *A. chroococcum* + الفطر *T. harzianum* ٧- الفطر R.solani (Rs6)+المبيد الكيميائي Beltanol ٨- البكتريا *A. chroococcum* بمفردها 9 - الفطر *T. viride* بمفرده 10- الفطر *T. harzianum* بمفرده ١١ - البكتريا *A. chroococcum* + الفطر *T. viride* ١٢- البكتريا *A. chroococcum* + الفطر *T. harzianum* ١٣- المقارنة ( نبات بمفرده دون اي اضافة).

نفذت التجربة باستخدام التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (C.R.D.) وبثلاث مكررات لكل معاملة، أضيف لقاح الفطر الممرض *R. solani* (Rs-6) محملا على بذور الدخن المحلي الى المعاملات التي تتطلب إضافة لقاح الفطر الممرض بنسبة 10 غم / أصيص قبل الزراعة مباشرة، وأضيف لقاح الفطر *T. harzianum* والفطر *T. viride* محملاً على بذور الدخن وبمعدل 10 غم / أصيص وبعد خمسة أيام اضيف لقاح الفطر الممرض، أضيف عالق البكتريا *A. chroococcum* (A-1) ($4\times10^{-6}$ وحدة تكوين مستعمرة Cfu/مل) الى التربة بمعدل 10 مل/أصيص قبل زراعة البذور مباشرة، بينما اضيف المبيد الكيميائي Belatanol بمعدل ١مل/لتر بعد يوم من اضافة الفطر الممرض.

## النتائج والمناقشة

**١. المسح الحقلي لمرض خناق بادرات القطن في بعض مناطق محافظة بابل**

أظهرت النتائج (جدول 1) وجود وانتشار مرض خناق بادرات القطن في جميع مناطق المسح في محافظة بابل وبنسب إصابة تراوحت بين 80-100% وشدة إصابة 40-86% وكانت أعلى شدة إصابة في عينات

منطقة الجيلاوية، مشروع المسيب، المنصوري، العزاوية و جبلة بنسبة إصابة 100% واعلى شدة اصابة كانت 86% في منطقة الجيلاوية، وقد يعود سبب ذلك إلى تكرار زراعة محصول القطن في تلك المناطق واستيطان الفطر المسبب في التربة لمدة طويلة بشكل أجسام حجرية مقاومة للظروف البيئية القاسية (Agrios، 2005)، في حين كانت الإصابة في المناطق المحاويل، مويلحة و أبو الجاسم بنسبة إصابة 80-90% واظهرت نتائج المسح ان شدة الاصابة كانت اقل في منطقتي المحاويل ومويلحة قياسا بالمناطق الاخرى، وربما يرجع السبب لاختلاف الإدارة أو لكون هذه المناطق زرعت لأول مرة بالمحصول. اذ يعد مرض خناق القطن من اخطر الامراض التي تصيب هذا المحصول وتسبب خسائر كبيرة في زراعته وانتاجه (Rothrock، 2015)، فقد وجد مطلوب (2014) ان الفطر *R.solani* يهاجم البذور ويقتل البادرات قبل الانبات وبعده وبالتالي يضطر المزارع الى اعادة الزراعة والترقيع وضياع الموعد الملائم للزراعة وتعريض المحصول لمختلف الافات والامراض، فضلا عن ان النباتات المصابة تكون ذات جذور ضعيفة ونمو خضري متقزم (Kennett، 2009 و Omar وآخرون، 2009).

**جدول. 1 المسح الحقلي لمرض خناق بادرات القطن في بعض حقول محافظة بابل للموسم الزراعي 2013**

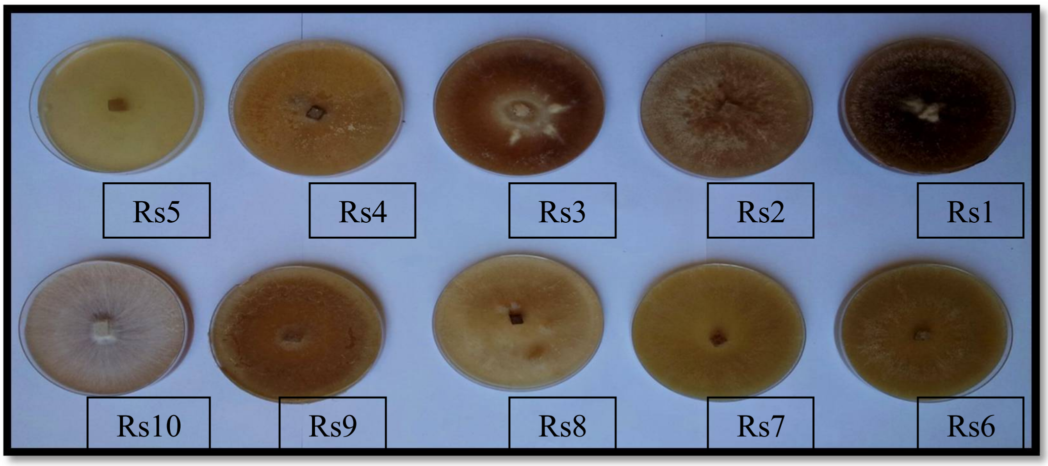
| رقم العينة | المنطقة | مساحة الحقل/دونم | %الإصابة | %شدة الإصابة |
|---|---|---|---|---|
| **1** | مشروع المسيب | 2 | 100 | 82 |
| **2** | الجيلاوية | 2 | 100 | 86 |
| **3** | العزاوية | 2 | 100 | 70 |
| **4** | أبو الجاسم | 1 | 80 | 50 |
| **5** | البدعة | 2 | 90 | 64 |
| **6** | الوطيفية | 3 | 80 | 56 |
| **7** | المحاويل | 1 | 80 | 40 |
| **8** | مويلحة | 2 | 90 | 42 |
| **9** | المنصوري | 4 | 100 | 80 |
| **10** | جبلة | 2 | 100 | 70 |

**2. عزل وتشخيص الفطر *Rhizoctonia solani* من نباتات القطن المصابة**

أظهرت نتائج العزل والتشخيص من جذور وقواعد سيقان النباتات المصابة ظهور 10 عزلات من الفطر *R. solani* (صورة ٢)، ولوحظ التباين في لون المستعمرات من البني الفاتح في بداية النمو ثم تحوله إلى درجات متفاوتة من اللون البني والبني الغامق وتباين سرعة النمو للعزلات وتكوين الأجسام الحجرية وغزارة الغزل الفطري الهوائي. وأوضح الفحص المجهري (صورة ٣) أن الغزل الفطري للفطر *R. solani* مقسم وله تفرعات وتكون التفرعات الحديثة بزاوية حادة وهي من الصفات التصنيفية الثابتة وأما التفرعات القديمة تكون بزاوية قائمة ولوحظت تخصرات في منطقة نشوء التفرع ووجود حاجز بالقرب من هذه المنطقة مع عدم وجود الوان اخرى وتراكيب مميزة مثل السبورات الجنسية واللاجنسية ولوحظت الخلايا البرميلية متجمعة وبشكل سلاسل في أماكن تكوين الأجسام الحجرية. وتنطبق هذه الصفات مع صفات الفطر *R. solani* وحسب ما ذكرتها المصادر التصنيفية المعتمدة (Parmeter و Whitney، 1970 و Sneh، 1996)، وتتفق النتائج مع ما

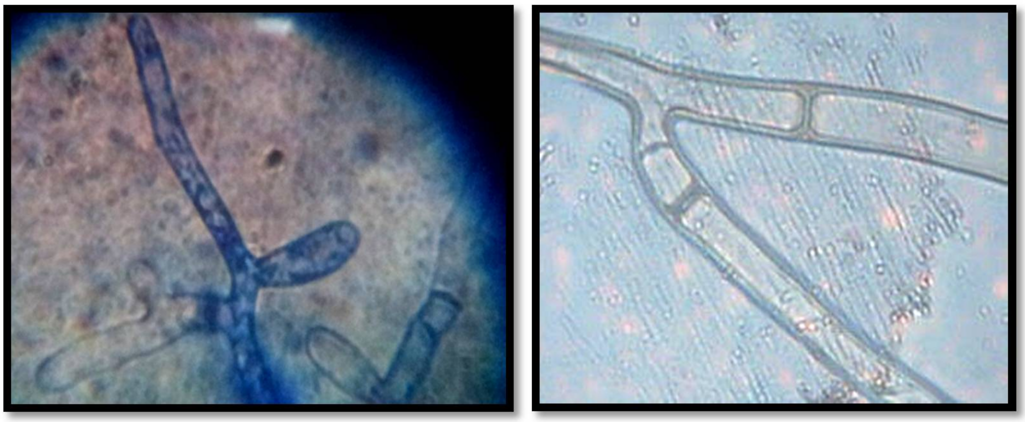
ذكره (Lucas وآخرون، 1985 و Sharon، 2010 و Khedri وآخرون، 2014) من أن الفطر *R. solani* يمتلك سلالات عديدة تختلف في صفاتها المزرعية وتدرجها اللوني.

وأظهرت نتائج الفحص ألمجهري لأطراف الخيوط الفطرية الحديثة للفطر *R. solani* لجميع العزلات Rs1-Rs10 أن عدد الانوية الظاهرة بلون ازرق غامق تراوح ما بين ثلاث الى تسع انويه مما يشير إلى أن هذه العزلات هي من نوع Multinucleate (صورة ٣) ولوحظ أن الانوية يقل عددها في المناطق البعيدة عن الأطراف وهذا يؤكد أنها من نوع *R. solani* ولكونها تحتوي على أكثر من ثلاث انويه في الخلية الطرفية للخيط الفطري وهذا يتفق مع ما ذكرته الجراح (2011) من أن عزلة الفطر تحتوي على ثلاث انوية في الخلية الطرفية وان الخلايا المجاورة للخلية الطرفية فيمكن ان تلاحظ فيها اعداد مختلفة من الانوية، و ان الخيوط الفطرية للفطر الممرض *R. solani* تحتوي عادة على أكثر من نواتين وفي حال وجود النواتين في طرف الخيط الفطري فإنها لا تتبع النوع *R. solani* بل أنواعا أخرى تكون غير ممرضة للنبات وقد تستخدم كعامل مقاومة إحيائية ضد العزلات الممرضة (Ross وآخرون، 1998 و Sharon، 2010).




**صورة ٢. عزلات الفطر *R. solani* والتباين في ألوان المستعمرات وصفاتها المزرعية**

*Rs تمثل عزلة الفطر *R. solani* و العدد بجانب رمز الفطر يمثل رقم العزلة



(ب) (أ)

**صورة ٣. الصفات المجهرية للفطر *Rhizoctonia solani* ، أ-الغزل الفطري الحديث المتفرع بزاوية حادة وهي إحدى الصفات التصنيفية الثابتة، كما يلاحظ وجود التخصر والحاجز قرب منطقة التفرع وهي من الصفات الثابتة للفطر. ب-الخلايا البرميلية وتعدد نوى الخيط الفطري.**

**٣. اختبارات المقدرة الامراضية**

**3-1. الكشف عن العزلات الممرضة للفطر *Rhizoctonia solani* باستخدام بذور الفجل**

أظهرت النتائج (جدول 2) أن معظم عزلات الفطر *R. solani* المختبرة أدت إلى خفض معنوي في نسبة إنبات بذور الفجل وأحدثت نسب إصابة متباينة، إذ منعت العزلتان Rs6 و Rs7 إنبات البذور بالكامل وبنسبة إصابة 100% قياسا بمعاملة المقارنة من دون إضافة الفطر والتي بلغت نسبة إنبات بذور الفجل فيها 100% ونسبة الإصابة (بذور متعفنة او بادرات مصابة) 0.00%، تلتها وبدون فروق معنوية العزلتان Rs9 و Rs2 إذ خفضت نسبة الإنبات إلى 6.67 و 8.00% على التوالي ونسبة إصابة بلغت 100% لكليهما بينما حققت العزلات Rs4 و Rs3 و Rs1 و Rs8 نسب إنبات 65.33 و 81.33 و 88.00 و 94.67% ونسب إصابة 100 و 96.00 و 81.00 و 74.67% على التوالي، أما العزلتان Rs5 وRs10 فلم تحققا خفضا معنويا في نسبة إنبات بذور الفجل وكانت نسبة الإنبات عالية بلغت 100% لكليهما وعند الاستمرار بمتابعة التجربة لوحظ اصابة للبادرات وبنسبة إصابة 5.33% و 57.33% على التوالي.

وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره جبر والربيعي (2008) وعبدو وآخرون (2012) في أن عزلات الفطر *R.solani* المختلفة تتباين في نسبة إصابتها للبذور. وقد يعود ذلك إلى الاختلاف بين عزلات الفطر التي جمعت من مناطق مختلفة، واختلافها في مقدرتها على إفراز المواد السامة والأنزيمات المحللة للبكتين Pectolytic Enzyme لاسيما أنزيم Polygalacturonase إذ أن العزلات غير الممرضة تكون ذات فعاليه واطئة في إنتاج هذا الأنزيم (Papavizas و Ayers، 1965)، أو قد يفرز الفطر *R.solani* عددا من الإنزيمات الاخرى منها Cutinase و Cellulose و Protease التي لها اثر كبير في قتل الجنين واحداث التعفن ومنع البذور من الانبات (Wyllie، 1962 و Van-Etten وآخرون، 1967 و Bertagnolli وآخرون، 1996 و علوان وفراس، 2010).

**جدول ٢. تأثير عزلات الفطر *Rhizoctonia solani* في النسبة المئوية لإنبات بذور الفجل وفي النسبة المئوية للإصابة**

| العزلات | %لانبات بذور الفجل | %لاصابة بذور الفجل |
|---|---|---|
| **Rs1** | 88.00 | 81.00 |
| **Rs2** | 8.00 | 100 |
| **Rs3** | 81.33 | 96.00 |
| **Rs4** | 65.33 | 100 |
| **Rs5** | 100 | 5.33 |
| **Rs6** | 0.00 | 100 |
| **Rs7** | 0.00 | 100 |
| **Rs8** | 94.67 | 74.67 |
| **Rs9** | 6.67 | 100 |
| **Rs10** | 100 | 57.33 |
| **Control** | 100 | 0.0 |

| | | |
|---|---|---|
| **LSD عند مستوى 0.05** | 11.46 | 9.47 |

*Rs تمثل عزلة الفطر *R. solani* و العدد بجانب رمز الفطر يمثل رقم العزلة

**3-2. تأثير بعض العزلات الممرضة للفطر *Rhizoctonia solani* على بذور القطن وبادراتها**

أشارت النتائج (الجدول ٣) إلى أن معظم عزلات الفطر *R. solani* المختبرة (Rs2، Rs4، Rs5، Rs6 و Rs7) سببت إصابة معنوية بمرض تعفن البذور وموت بادرات القطن قبل الإنبات وبعده في حين أن العزلة Rs5 سببت إصابة طفيفة بالمرض، وكانت النسبة المئوية لإنبات بذور القطن المضاف إليها عزلات الفطر Rs2-Rs4-Rs6-Rs7 بعد أربعة أيام من الزراعة 20.0-36.7-0.0-0.0 % على التوالي وبفارق معنوي كبير عن المقارنة من دون إضافة الفطر الممرض التي كانت فيها النسبة المئوية للإنبات 100%، بينما وصلت إلى 80% في المعاملة المضاف إليها العزلة Rs5 في حين أصبحت النسبة المئوية لإنبات بذور وبادرات القطن بعد 10 أيام من الزراعة والمضاف إليها العزلات Rs2-Rs4 هي صفر و نسبة الإصابة وشدة الإصابة لها 100% قياسا بمعاملة المقارنة من دون إضافة الفطر الممرض والتي كانت نسبة إنباتها 100% ونسبة الإصابة وشدة الإصابة صفرا وذلك بسبب استمرار مهاجمة الفطر الممرض للبادرات البازغة فقد هاجمها عند سطح التربة مما ادى الى تعفن منطقة التاج وتخصرها بشكل واضح وسقوط البادرة على سطح التربة وموتها وهي من الاعراض المميزة لمرض خناق بادرات القطن اذ يهاجم الفطر البذور ويسبب تعفنها اويهاجم البادرة قبل او بعد بزوغها فوق سطح التربة (Rothrock، 2015)، أما معاملة إضافة العزلة Rs5 فقد بلغت نسبة إنباتها 70% ونسبة الإصابة 10.4% وشدة الإصابة 12.7% وجاءت هذه النتائج مطابقة لنتائج اختبار المقدرة الامراضية على بذور الفجل ونتائج اختبار سرعة النمو للعزلات وعلاقتها بالامراضية إذ أن العزلة Rs6-Rs7 كانت اعلى مقدرة امراضية على بذور الفجل وحققت اعلى سرعة نمو وتليها العزلة Rs4، بينما كانت العزلة Rs5 ذات نسبة وشدة إصابة ضعيفة على بذور الفجل. وهذه النتائج تتفق مع الجراح (2011) في أن عزلات الفطر *R. solani* تختلف في قدرتها الامراضية.

**جدول ٣. تأثير بعض العزلات الممرضة للفطر *Rhizoctonia solani* في انبات بذور القطن والبادرات تحت ظروف الظلة الخشبية**

| العزلات | بعد4 أيام من الزراعة | بعد 10 أيام من الزراعة | | |
|---|---|---|---|---|
| | % لإنبات البذور | % لإنبات البذور وبزوغ البادرات | % للإصابة | % لشدة الإصابة |
| **Rs2** | 20.0 | 0.0 | 100 | 100 |
| **Rs4** | 36.7 | 0.0 | 100 | 100 |
| **Rs5** | 80.0 | 70.0 | 40.0 | 12.7 |
| **Rs6** | 0.0 | 0.0 | 100 | 100 |
| **Rs7** | 0.0 | 0.0 | 100 | 100 |
| **المقارنة** | 100 | 100 | 0.0 | 0.0 |
| **LSD عند مستوى 0.05** | 20.96 | 3.63 | 7.26 | 3.02 |

*Rs تمثل عزلة الفطر *R. solani* و العدد بجانب رمز الفطر يمثل رقم العزلة

**4- عزل بكتريا *Azotobacter chroococcum* من التربة وتشخيصها**

**4-1 الصفات المظهرية(المزرعية) Morphologic aspects**

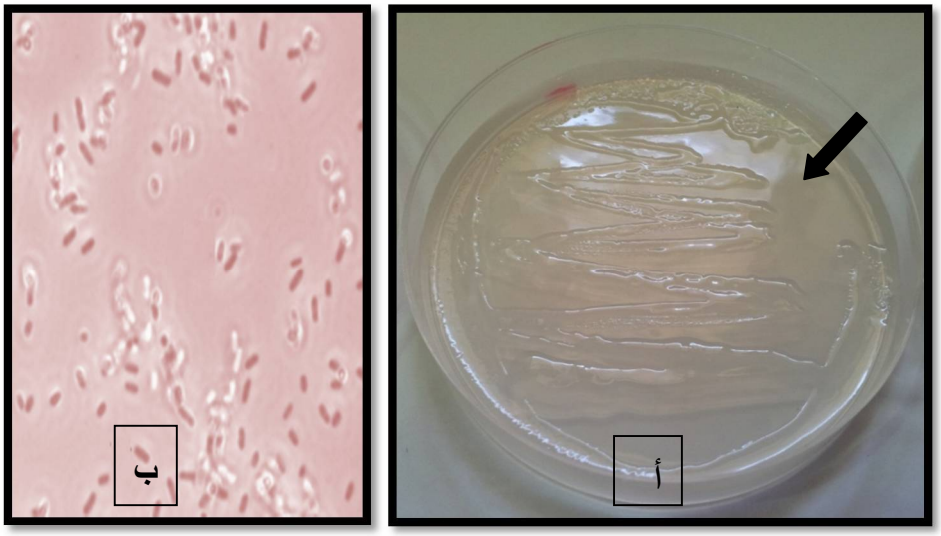
تم الحصول على 3 عزلات من البكتريا *A. chroococcum* عزلت من عينات التربة حول جذور نباتات الحنطة والشعير، وبينت النتائج (الجدول ٤) أن المستعمرات النامية على وسط SMSA كانت لزجة ومرتفعة ومحدبة و ناعمة و لماعة و معتمة غير شفافة و متوسطة الحجم الى كبيرة وتتدرج الى اللون البني كلما ازداد بقائها على وسط النمو فترة أطول (صورة 5) وتتفق هذه النتائج مع ما وجده كل من مطلوب (2012) و دايخ (2013) و هاشم (2014) من أن البكتريا *A. chroococcum* كانت من الأنواع السائدة في الترب الزراعية العراقية. و بينت نتائج الفحص ألمجهري للشرائح الزجاجية بعد تثبيت الغشاء البكتيري المصبغ بصبغة گرام أن أشكال الخلايا البكتيرية كانت عصوية و قصيرة و كبيرة الحجم و سالبة لصبغة گرام. غالباً ما تكون على شكل أزواج (صورة 5) وتتطابق هذه الصفات مع الصفات المزرعية والمجهرية للجنس *Azotobacter* وهذا ما اكدته العديد من الدراسات السابقة التي اهتمت بدراسة صفات هذه البكتريا (Shankarappa و Madhav Rao، 1998).

**جدول ٤. الصفات المظهرية (المزرعية) لمستعمرات البكتريا *Azotobacter chroococcum***

| رمز العزلة | اسم المنطقة /نبات | كثافة النمو | شكل النمو | لون المستعمرة | شكل سطح المستعمرة |
|---|---|---|---|---|---|
| **A1** | بابل-العزاوية / حنطة | +++ | لزجة | بنية غامقة | ناعمة معتمة |
| **A2** | بابل-الوطيفية / شعير | +++ | لزجة | بنية فاتحة لماعة | ناعمة شفافة |
| **A3** | بابل-الوطيفية / حنطة | ++ | لزجة | بنية غامقة لماعة | ناعمة معتمة |

*A رمز عزلة الكتريا *A.chroococcum*، العدد بجانب العزلة يمثل رقم العزلة

*++ نمو متوسط *+++ نمو كثيف



**صورة 5. بعض الصفات المظهرية لمستعمرات البكتريا *Azotobacter chroococcum* *A=عزلة البكتريا *A. chroococcum*، أ- بكتريا *A. chroococcum* نامية على الوسط الزرعي الصلب SMSA**

**ب- البكتريا *Azotobacter chroococcum* مصطبغة بصبغة كرام، كما تظهر تحت المجهر الضوئي (x100)**

### 4-3. الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

بينت النتائج (جدول 5) الخاصة بالصفات الكيموحيوية المستعملة للتفريق بين الأنواع التابعة للجنس *Azotobacter*، ان جميع العزلات كانت لها قدرة في تثبيت النتروجين و استغلال المصادر الكربونية المختلفة (المانيتول، الكلوكوز، السكروز، النشأ) وقدرتها على النمو في الوسط الحاوي على1% كلوريد الصوديوم وعدم قدرتها على النمو في وسط بيرك الحاوي على 10 غم من بنزوات الصوديوم والذي يعد وسط تفريقي حيث لا تنمو عليه بكتريا نوع *A.chroococcum* بينما تنمو عليه انواع اخرى تابعة للجنس نفسه، كما نمت العزلات في درجة حرارة 37 م° وبينت نتائج اختبار الحركة ان البكتيريا متحركة حركة انتقالية حقيقية نشطة، وتراوحت أعداد البكتيريا في 1 مل معلق بكتيري بعمر 3 أيام بين $2.5-5\times10^{-6}$ وحدة تكوين مستعمرة CFU. ويتضح من النتائج أن جميع العزلات كانت تابعة للنوع *A. chroococcum* وتتفق هذه النتائج مع ما جاء به كل من Al-Azawy (2010) ومطلوب (2012) وهاشم (2014) من أن جميع الاختبارات الكيموحيوية والفسيولوجية المستعملة للتفريق بين الأنواع التابعة للجنس *Azotobacter* اثبتت انها تابعة للنوع *A. chroococcum* .

**جدول ٥. الصفات الكيموحيوية والفسيولوجية التفريقية لتشخيص بكتريا *Azotobacter chroococcum***

| رقم العزلة | اعداد البكتريا Cfu /مل $\times10^{-6}$ | كمية N المثبتة % | استهلاك مصادر الكاربون المختلفة | | | | النمو في 1% NaCl | وسط بيرك | اختبار الحركة | النمو في 37مْ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | مانيتول | كلوكوز | سكروز | نشا | | | | |
| A1 | 4 | 0.19 | + | + | + | + | + | − | + | + |
| A2 | 2.5 | 0.08 | + | + | + | + | + | − | + | + |
| A3 | 5 | 0.12 | + | + | + | + | + | − | + | + |

*** Aرمز عزلة البكتريا *A. chroococcum*، والعدد بجانب العزلة يمثل رقم العزلة *+ يوجد نمو *- لايوجد نمو**

**٥. اختبار المقدرة التضادية للبكتريا *Azotobacter chroococcum* في تثبيط نمو الفطر *Rhizoctonia solani* على وسط PSA**

حققت عزلة البكتريا *A. chroococcum* (A1) نسبة تثبيط بلغت 100% ضد الفطر *R. solani* (Rs6) على وسط PSA مختبريا قياساً بمعاملة المقارنة التي كانت نسبة التثبيط فيها صفرا وقد يعزى سبب ذلك إلى قابلية البكتريا على منافسة الفطر الممرض في استغلال الوسط الغذائي بشكل جيد مما يحد من نموه، فقد أظهرت التجارب التي قام بها مطلوب و جبر (2012) سهولة نمو البكتريا *A. chroococcum* على الوسط PSA الخاص بالفطريات معللا" ذلك إلى أن الوسط غني بالمواد الكربوهيدراتية لاسيما السكروز الذي يعد مكونا" اساسيا" للوسط التخصصي .S.M.S أو قد يعود ذلك إلى المواد الايضية المضادة التي تفرزها هذه البكتريا (Chet وآخرون، 1990 و Hillel ، 2005 و Al- Azawy –Al، 2010). وتتفق النتائج مع Al-Azawy (2010) الذي أثبتت إن عزلات من البكتريا *A.chroococcum* حققت اكبر خفض معنوي في معدل النمو القطري ضد الفطر الممرض *R.solani* مختبريا، وفي دراسة أخرى تمكنت البكتريا *A.chroococcum* من تثبيط الفطر الممرض *R.solani* بنسب تراوحت بين 66.33-100% على الوسط الزرعي PSA مختبريا (Matloob وJuber،2013).

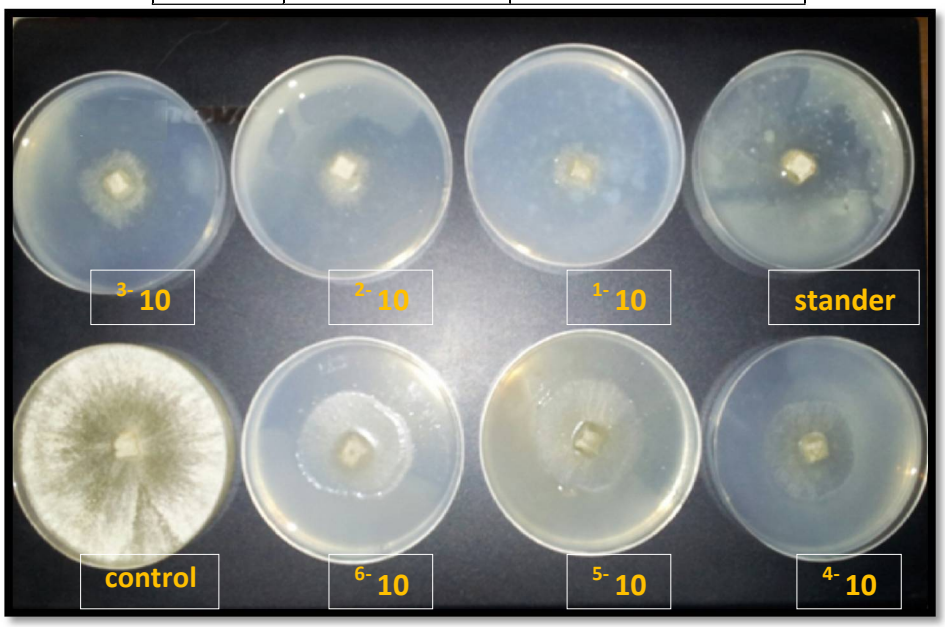
**٦. تحديد التخفيف الفعال من لقاح البكتريا *Azotobacter chroococcum* المثبط لنمو الفطر *Rhizoctonia solani***

أحدثت جميع التخافيف المستعملة ($10^{-1}$ – $10^{-6}$) خفضا معنويا في النسبة المئوية لتثبيط نمو الفطر *R. solani* (Rs6) مقارنة بمعاملة الفطر الممرض من دون إضافة البكتريا وكلما كان تركيز البكتريا *A. chroococcum* اكبر كلما ازدادت النسبة المئوية لتثبيط الفطر *R. solani* (جدول ٦) إذ تراوح معدل نمو عزلات الفطر الممرض بين 0.50- 3.2 سم ونسبة تثبيط بين 64.04-94.33% في الوقت الذي وصل فيه معدل نمو عزلة الفطر من دون إضافة البكتريا 9 سم (صورة ٦) واوضحت النتائج عدم وجود فرق معنوي بيت التخفيف $10^{-1}$ و $10^{-2}$ والتي كان معدل نمو الفطر فيها 0.5 سم ونسبة التثبيط فيها 94.33%. أن تأثير بكتريا *A. chroococcum* في نمو الفطريات الممرضة للنبات قد يعود إلى مقدرة البكتيريا على إنتاج مواد ايضية ومركبات عضوية و أندول حامض الخليك وبعض الانزيمات والمضادات الحيوية وإنتاج سيانيد الهيدروجين وغيرها، فضلاً عن منافستها للممرضات على المكان والمواد الغذائية (Pridachina وآخرون، 1982 و Hillel، 2005 و Yasari و Patwardhan ، 2007 و Gholami ، 2011). ومن مشاهدات هذه التجربة ان الخيوط الفطرية النامية في الاطباق المعاملة بتخافيف البكتريا *A. chroococcum* بدات بالخفوت والتحلل التدريجي مما يؤشر امكانية استمرار البكتريا بالتضاعف والازدياد باعدادها مما مكنها من انتاج مواد وانزيمات قد يكون لها دور رئيس في تحليل الفطر الممرض وموته (صورة 6).

**جدول 6. تأثير التخافيف المختلفة من لقاح البكتريا *Azotobacter chroococcum* في النسبة المئوية لتثبيط نمو الفطر *Rhizoctonia solani* على وسط PSA**

| التخفيف | قطر المستعمرة/سم | % للتثبيط |
|---|---|---|
| **Stander** | 0.00 | 100 |
| **$10^{-1}$** | 0.50 | 94.33 |

| | | |
|---|---|---|
| 94.33 | 0.50 | $10^{-2}$ |
| 91.37 | 0.77 | $10^{-3}$ |
| 85.93 | 1.27 | $10^{-4}$ |
| 79.63 | 1.83 | $10^{-5}$ |
| 64.04 | 3.23 | $10^{-6}$ |
| 0.00 | 9.00 | Control |
| 2.1 | 0.19 | LSD عند مستوى 0.05 |




**صورة 6. تأثير التخافيف المختلفة من لقاح البكتريا *Azotobacter chroococcum* في تثبيط نمو مستعمرة الفطر *Rhizoctonia solani* على وسط PSA**

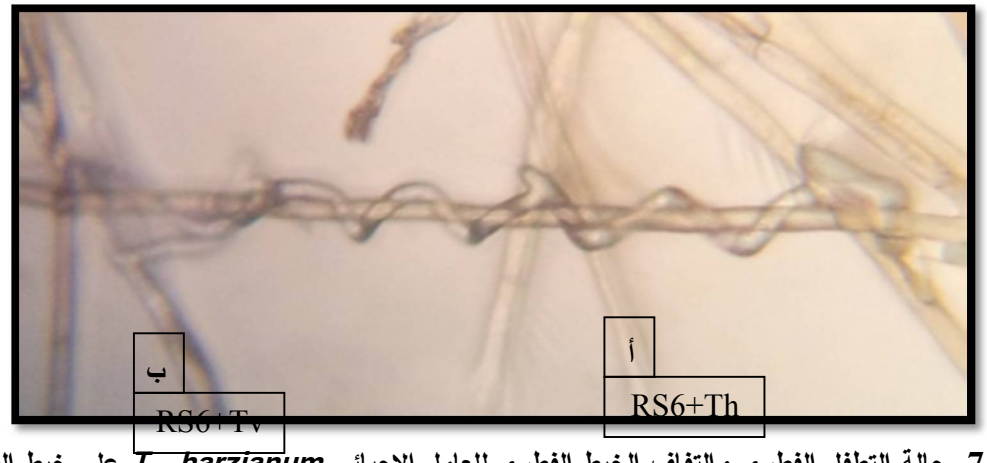
**٧. اختبار المقدرة التضادية للفطر *Trichoderma harzianum* و الفطر*T. viride* في تثبيط نمو الفطر *Rhizoctonia solani* على وسط PSA**

بينت النتائج أن فطري المقاومة الأحيائية *T. harzianum* و *T. viride* حققا نسبة تثبيط عالية للفطر *R. solani* (RS6) على وسط PSA مختبريا بلغت الدرجة 1 و 2 على التوالي حسب السلم الذي وضعه Bell واخرون (1982)، وتتفق هذه النتائج مع ما وجده Siameto واخرون (2011) و مطلوب (2012) وكريم (2012) والتي اشارت الى قدرة الفطر *T. harzianum* في تثبيط النمو القطري للفطر *R. solani* مختبريا. وقد يعود السبب لقدرة الفطر *Trichoderma* sp. التضادية إلى إفرازه بعض الأنزيمات المحللة لجدر الخلايا مثل glucanases و chitinases أو أن هذا النوع من الفطريات ينتج مضادات حيوية مثل viridian و gliotoxin تؤثر على الفطر الممرض سلبا (Mujeebur وآخرون، 2004) أو إفرازه مضادات حيوية تمنع نمو الفطر الممرض (عبدو واخرون، 2012). ولوحظ من خلال الفحص المجهري أيضا أن الخيوط الفطرية للفطر *Trichoderma* sp. المتطفل قد نمت على طول الفطر *R. solani* وفي بعض الأحيان تلتف حول الخيوط الفطرية للمسبب المرضي وتنتج فروعا قصيرة تلتف حوله وتؤدي إلى تفكك جدار خلاياه والتطفل عليه، وهذه تعد من الملاحظات التأكيدية والنادرة الخاصة بدراسة حالة التطفل الفطري

Mycoparasitism بين الفطر *Trichoderma* spp. والفطر *R. solani* مسبب مرض خناق القطن ولأول مرة في العراق (صورة 7)، كما يتميز الفطر *T. harzianum* بقدرته التنافسية العالية وسرعة نموه وله القدرة على التطفل حيث يلتف على الخيوط الفطرية لعائله ويخترق جدران الخلايا ويفرغ محتواها من السايتوبلازم، ومن الدراسات التي أكدت على حدوث هذا النوع من التطفل ما ذكره Barakat و Al-Masri (2005) وBarakat واخرون (2006) و عبدو واخرون (2012) و Hussain واخرون(2014).

**٨. تقويم فاعلية العوامل الأحيائية *A.chroococcum*، *T.harzianum*، *T. viride* في نسبة و شدة الإصابة بمرض خناق بادرات القطن وبعض معايير النمو لبادرات القطن تحت ظروف الظلة الخشبية**

بينت نتائج التجربة (جدول 7) أن جميع المعاملات المستعملة أدت إلى رفع معنوي في النسبة المئوية للإنبات بلغت ١٠٠% لجميع المعاملات وخفض في النسبة المئوية لنسبة وشدة إصابة نباتات القطن بمرض خناق بادرات القطن وساهمت في زيادة معايير النمو المدروسة والمتمثلة بالوزن الطري والجاف للمجموعين الخضري والجذري وطول البادرة الكلي وبنسب متباينة قياسا بمعاملة الفطر الممرض بمفرده، فقد حقق التداخل




**صورة 7. حالة التطفل الفطري والتفاف الخيط الفطري للعامل الاحيائي *T. harzianum* على خيط الفطر العائل *R.solani***

مابين البكتريا *A.chroococcum* و الفطر *T.harzianum* بوجود الفطر الممرض أعلى نسبة خفض في نسبة وشدة الإصابة بلغت 6.67 و 1.33% في حين كانت نسبة الإنبات صفرا ونسبة وشدة الإصابة 100% في معاملة الفطر الممرض بمفرده وحققت زيادة معنوية عالية في الوزن الطري والجاف للمجموعين الخضري والجذري بلغت 7.10، 3.80، 3.73 و 1.33 غم على التوالي وبلغ طول البادرة الكلي 45.00 سم. تلتها معاملة التداخل ما بين البكتريا *A.chroococcum* والفطر *T. viride* والتي حققت خفضا معنويا في نسبة و شدة الإصابة بالفطر الممرض والتي بلغت 6.67 و 2.67% على التوالي وساهمت في زيادة الوزن الطري والجاف للمجموعين الخضري والجذري بمقدار 6.23، 3.47، 2.80 و1.20 غم على التوالي و حققت زيادة معنوية في طول البادرة الكلي بلغت 39.83 سم. واوضحت النتائج كفاءة الفطر *T.harzianum* و الفطر *T. viride* و البكتريا *A.chroococcum* في خفض نسبة و شدة الإصابة بالفطر الممرض وفي زيادة الوزن الطري والجاف للمجموعين الخضري والجذري وطول البادرة الكلي مقتربة من معاملة المبيد الكيميائي Beltanol الذي خفض نسبة وشدة الاصابة الى ٦.٦٧ و١.٣٣% على التوالي. وتعزى كفاءة المبيد Beltanol

في خفض النسبة المئوية لشدة الإصابة إلى فعاليته العالية في التأثير في الفطريات الممرضة ومن ثم خفض نسبة وشدة الإصابة الناجمة عنها فضلا عن تكوين مركبات مخلبية مع النحاس في أنسجة العائل وهذا يسهل مروره إلى داخل خلايا الممرض وبعدها يتحرر ويؤدي إلى قتل المسبب المرضي (Meister، 2000)، وقد يعلل الفعل التثبيطي للفطر *T.harzianum* باستعمار الفطر للتربة و الأجزاء النباتية كالجذور مما يمكنه من منافسة الممرضات الفطرية على المواد الغذائية و كذلك فعاليته التنظيمية لتطور النبات فضلا عن استحثاث الميكانيكية الدفاعية للنباتات، و يعمل على إنتاج الإنزيمات المحللة للجدار الخلوي للمسببات المرضية مثل B-1,3-glucanases وB-1,6-glucanases و Chitinases و Lipasesو Proteases كذلك ما ينتجه من المضادات الحيوية التي تؤهله على التطفل على الفطريات الممرضة فتعمل على قتلها و الحد من نموها فضلا عن تحسين الحالة التغذوية للنبات وانتاج منظمات النمو وتحليل المواد العضوية وزيادة تيسير العناصر الغذائية للنبات (Saba وآخرون، 2012 و Munir وآخرون، 2014 و Hasan وآخرون، 2014). ويعزى السبب في رفع معايير النمو في معاملات الفطر الاحيائي *T. viride* الى ما يمتلكه من قدرة على استحثاث المقاومة الجهازية للنبات من خلال رفع فعالية الانزيمات بيروكسيديز وبولي فينيل اوكسيدز و كتاليز للجذور وينعكس ذلك على محتوى الفينولات الكلي (الطائي، 2010)، واكد Krupa واخرون (2014) ان الفطر *T. viride* من الفطريات المعروفة حاليا في المكافحة الحيوية للفطر الممرض *R.solani* (Poldma وآخرون، 2000) لما يمتلكه من اليات عدة تؤثر فيها سلبا على الفطر الممرض وايجابا على النبات مثل انتاج السيدروفور و سيانيد الهايدروجين و انتاج الهرمونات مثل الأوكسين والجبرلين و تحويل المواد العضوية والمعدنية إلى صورة ميسرة للنبات (Zehnder وآخرون، 2001)، ايضا تعد البكتريا *A. chroococcum* ضمن البكتريا المحفزة لنمو النبات Plant Growth Promating Rhizomicroorganisam (PGPR) والمعروفة بقدرتها التضادية العالية ضد المسببات المرضية المستوطنة في التربة ومنها الفطر *R. solani* (مطلوب، 2012 و هاشم، 2014 و المعموري، 2014). وأوضحت النتائج أن إضافة عوامل المكافحة الأحيائية الى النبات بمفردها او متكاملة مع بعضها لم يؤثر على بذور القطن ونسب انباتها و وفر لها حماية من الاصابات اللاحقة اذ كانت النسبة المئوية للانبات في معاملاتها 100% ونسبة وشدة الاصابة صفر%. ولم تظهر فيها أي إصابة بالمرض وكانت هذه النتيجة مطابقة لمعاملة المقارنة من دون إضافة الفطر الممرض إذ بلغت النسب المئوية للانبات فيها 100% والنسبة المئوية للاصابة وشدة الإصابة في جميع هذه المعاملات صفرا %، و يعكس عدم وجود تاثير ضار لعوامل المكافحة المستعملة على بذور القطن ونباتاتها.

**جدول 7. تأثير بعض العوامل الأحيائية في نسبة وشدة الاصابة بمرض خناق بادرات القطن و بعض معايير نمو بادرات النبات تحت ظروف الظلة الخشبية**

| المعاملات | الانبات (%) | نسبة الاصابة (%) | شدة الاصابة (%) | الوزن الطري الخضري/ غم | الوزن الطري الجذري/ غم | الوزن الجاف الخضري/ غم | الوزن الجاف الجذري/غم | طول البادرة الكلي/سم |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rs6 | 0.00 | 100 | 100 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | 0.0 | 0.00 |
| Bel+ Rs6 | 100 | 6.67 | 1.33 | 5.00 | 2.23 | 1.67 | 0.40 | 27.00 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 26.00 | 0.33 | 1.57 | 2.20 | 4.77 | 16.00 | 40.00 | 100 | *A. ch.* +Rs6 |
| 28.67 | 0.50 | 1.83 | 2.30 | 5.33 | 9.33 | 26.67 | 100 | *T. v.* + Rs6 |
| 34.50 | 0.80 | 2.33 | 2.70 | 5.73 | 6.67 | 20.00 | 100 | *T. h.* + Rs6 |
| 39.83 | 1.20 | 2.80 | 3.47 | 6.23 | 2.67 | 6.67 | 100 | *T. v.* + *A. ch.* + Rs6 |
| 45.00 | 1.33 | 3.73 | 3.80 | 7.10 | 1.33 | 6.67 | 100 | *T. h.* + *A. ch.*+ Rs6 |
| 35.33 | 0.93 | 2.50 | 2.47 | 5.93 | 0.00 | 0.00 | 100 | *A. ch.* |
| 36.17 | 1.00 | 2.53 | 2.97 | 6.13 | 0.00 | 0.00 | 100 | *T. v.* |
| 41.00 | 1.30 | 3.33 | 3.07 | 6.90 | 0.00 | 0.00 | 100 | *T. h.* |
| 45.33 | 1.40 | 4.07 | 2.77 | 7.57 | 0.00 | 0.00 | 100 | *T. v.* + *A. ch.* |
| 48.33 | 1.43 | 4.17 | 4.03 | 8.10 | 0.00 | 0.00 | 100 | *T. h.* + *A. ch.* |
| 29,50 | 0.57 | 1.89 | 2.30 | 5.37 | 0.00 | 0.00 | 100 | Control |
| 0.18 | 0.14 | 0.28 | 0.22 | 0.29 | 1.95 | 9.47 | 4.91 | LSD |

Beltanol =Bel *A.chroococcum*=A.ch. و *T. viride*=T.v. ، *T.harzianum*=T.h. ،*R. solani*=Rs*

**المصادر**


الجبوري، خالد خليل و خالد محمد داؤد و وليد محمد شيت العبدربة. 2011. استخدام تقنية التخصيب الحيوي بالمخصب EM1 على بعض المحاصيل الحقلية الهامة. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية 11(20).

الجراح، نيران سالم احمد. 2011. تاثير الخليط الحيوي EM1 والمجال المغناطيسي في حماية نباتات الخيار من الاصابة بمسببات التعفن وسقوط البادرات. اطروحة دكتوراه. قسم الوقاية. جامعة بغداد.

الجهاز المركزي للاحصاء. وزارة التخطيط، مديرية الاحصاء الزراعي – جمهورية العراق. ٢٠١٢.

الحديثي، هديل توفيق . (١٩٨٣). الكتاب العملي في اساسيات علم البكتريا . مطبعة جامعة البصرة.١١٢ ص.

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

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

الطائي، ورقاء سعيد قاسم. 2010. اختبار كفاءة عزلات من *Trichoderma* في استحثاث بعض الإنزيمات الدفاعية ضد الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp *.lycopersici* في نباتات الطماطة. مجلة زراعة الرافدين.38 (ملحق 2).

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

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

مطلوب، عهد عبد علي هادي، 2012، تحديد مسببات تعفن جذور وقواعد سيقان الفاصوليا وتقويم فعالية بعض عوامل المكافحة الأحيائية في مـــــقاومتها، اطروحة دكتورا، كلية الزراعة – جامعة بغداد.

مطلوب، عهد عبد علي هادي. 2014. كفاءة بعض المستخلصات النباتية والعوامل الاحيائية ضد الفطر *Rhizoctonia solani* kuehn مسبب مرض تعفن جذور وقواعد سيقان القطن. مجلة الفرات للعلوم الزراعية – 6(2): 213-223.

هاشم، علي جاسم عبد. 2014. تأثير عوامل المقاومة الحيوية في نمو و إنتاج الطماطة وتقويمها في مقاومة نوعي الفطر *Fusarium* في محافظة بابل. رسالة ماجستير. الكلية التقنية المسيب.

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology . 5th Ed. Elsevier Inc. USA. 998pp.

Alabouvette, L. 2000. Biological control of plant disease and the environment. Symposium and plant protection and the environment: Pesticides and their alternatives. E-mail: claude. Alabouvette@diion. Inra. fr.

AL-Azawy, A.Q.W. 2010. Efficiency of interaction between *Azotobacter* sp.and *arbuscular mycorrhizal* fungi for their potential to stimulate tomato (*Lycopersicon escolentum* Mill.) plant resistance to root rot disease. Diss. College of Science-Baghdad Univ.112 pp.

Allen, O. N. 1959. Experiments in soil bacteriology. J. Bacteriology. 27: 325-339.

Ardekani S, A. Heydari, N. Khorasani, M. Arjmandi and R. Ehteshami. 2009. Preparation of new biofungicides using antagonistic bacteria and mineral compounds for controlling cotton seedling damping-off disease. J. Plant Prot. Res. 49: 49-55.

Barakat, R. and M. Al-Masri. 2005. Biological control of gray mold disease (*Botrytis cinerea*) on tomato and bean plants by using local isolates of *Trichoderma harzianum*. Dirasat, Agricultural Sciences 32(2), 145-156.

Barakat, R., F. Al-Mahareeq and M. Al-Masri. 2006. Biological control of *Sclerotium rolfsii* by using indigenous *Trichoderma* spp. Isolates from Palestine. Hebron University Research J. 2(2), 27-47.

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

Benuzzi, M., A. Minuto and M. L. Gullino. 2004. Biological agents for the control of soil- borne pathogens. International workshop, Comiso, Italy, 1-3 April 2004. 9pp.

Bertagnolli, B.L ; D. soglio and J.B. Sinclair. 1996. Extracellular enzyme profiles of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* isolate 2B. 12 and of two antagonists *Bacillus megaterium* strain. l. Possible correlation with inhibition of growth and biocontrol. Physiol. Mol. Plant Pathology. ( Cited from B. Senh, et., 1996).

Black, C. A. 1965. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbilogical properties. Amer. Soc. Agron. Inc. Bublisher Madison, Wisconsin, U.S.A.

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

Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen In : "Methodes of soil analysis" , Black, C. A. Evans, D.P., Ensminger,L.E., White,J.L., Clark,F.E., Dinauer,R.C. (Ed) part 2, American Society of Agronomy. Inc. Bublisher Madison Wisconsin, USA.

Chet, I, and R. Baker . 1981 . Isolation and biocontrol of Trichoderma hamatum from soil naturally suppressive of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 71: 286–290.

Den hond, f.; P. groenewegen and N. M. van straalen. 2003. Question around the persistence of the pesticide proplem. In: den hond, f.,. groenewegen P. and van straalen N. M. (eds) pesticides: proplems, emprovments, alternatves. Chapter 1. Blackwell science Ltd.

Edmisten, K. L., F. H. Yelverton, J. F. Spears, D. T. Bowman, J. S. Bacheler; S. R. Koenning, C. R. Crozier, A. D. Meijer and A. S. Culpepper. 2010. Cotton Information. North Carolina Cooperative Extension Service College of Agriculture and Life Sciences North Carolina State University. 209pp.

Gholami, A., Plant growth promoting rhizobacteria and agricultural research in Iran. 2011. hahrood University of Technology, Shahrood, IRAN.

Gomathinayagam, s., S. A. Persaud and M. Rekha. 2012. Comparative study of biological agents, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for controlling brown spot disease in rice. JBiopest, 5 (Supplementary): 28-32.

Hasan, S; G. Gupta, Sh. Anand and H. Kaur. 2014.Lytic Enzymes of *Trichoderma*: Their Role in Plant Defense.International Journal of Applied Research and Studies (iJARS).ISSN: 2278-9480 Volume 3, Issue 2.1-5pp.

Herr, L. J. 1979. Practical nuclear staining procedures for *Rhizoctonia* – like fungi. Phytopathology 69: 958–961.

Hillel, D. 2005. Plant Growth Promoting Bacteria. Elsevier, Oxford, U. K.,:103-115.

Hussain A.; M. S. Awan1; S. W. Khan; M. Anees; S. Ali; Q. Abbas and A. Ali. 2014. Bioefficacy of botanical extracts and bioagents against sclerotialIsolates of *Rhizoctonia solani*. Journal of biodiversity and Environmental Sciences (JBES). Vol. 4, No. 6, P. 370-380.

Kaewchai, S., K. Soytong and K. D. Hyde. 2009. Mycofungicides and fungal biofertilizers. Fungal diversity. 38:25-50.

Kennett, R.M. 2009. The evaluation of high tannin cotton lines for resistance to *Rhioctonia solani* and *Pythium aphanidermatum*. Texas A&M Univ.

Khedri, Z., A. Heydari and H. Azimi. 2014. Effects of damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* on growth characteristics of cotton seedlings. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. IJACS/2014/7-11/786-790.

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

Larkin, R.P. 2004. Development of integrated biological and cultural approaches for control of Powdery Scab and other soilborne disease. USDA, ARS, New England Plant, soil, and water lab Univer. of Maine, Orone, ME O 44469 WWW–Maine Potatos. com / Pdf / Potresgrant – 04.

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

Mansoori M, Heydari A, Hassanzadeh N, Rezaee S, Naraghi L. 2013. Evaluation of *Pseudomonas* and *Bacillus* Bacterial antagonists for biological control of cotton *Verticillium* wilt disease. J. Plant Prot. Res. 53: 154-157.

Matloob,A. a. H.; k. s. Juber. 2013.Biological control of bean root rot disease caused by *Rhizoctonia solani* under green house and field conditions.Agric. Biol. J. N. Am, 4(5): 512-519.

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

Meister, R. T. 2000. Farm chemical Handbook. Listing for Beltanol willough by OH. vol.86.p.45.

Mujeebur, Khan R., Shahana, M. Khan and F.A. Mohiddin, 2004. Biological control of Fusarium wilt of chickpea through seed treatment with the commercial formulation of *Trichoderma harzianum* and/or *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathol Mediterr, 43: 20-25.

Munir, Sh ; Q.Jamal, K. Bano, S. Kh. Sherwani, M. N.Abbas,S.Azam, A. Khan, Asadullah, S. Ali and M. Anees. 2014.*Trichoderma* and biocontrol genes: Review.Sci. Agri. 1 (2): 40-45.

Omar MR, E.M. Hussein, K.h.K Kasem. 2009. Pathogenicity and Protein Electrophoresis of Different Cotton *Rhizoctonia solani* Isolates. Egypt. J.Phytopathol. 37: 21-33.

Papavizas, G.C. and W.A. Ayers. 1965. Virulence Host Range and Pectolytic enzymes of single pasidiospore isolate of *Rhizoctonia praticola* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 55: 111-116.

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

Poldma, P., JaaKson, K., Merivee, A., Albrech, A. Metspalu, L.(ed), and Mitt,S. 2000. *Trichoderma viride* promotes growth of cucumber plants. Proceeding of the international Conference: Development of environmentally friendly plant protection in the Baltic Region, Tartu, Estonia September 28-29, 2000.

Pridachina, N. N., E. D. Novoqrudskaia, E. B. Kruqliak, E. V. Chekasina and T. S. Korchak. 1982. *Azotobacter chroococcum*, a producer of a new antifungal antibiotic. Antibiotiki. 27: 3-6.

Ross, R. E., A. P. Keinath and M. A Cubeta. 1998. Biological control of wirestem on cabbage using binucleate *Rhizoctonia* spp. Crop Prote - ction. 17: 99-104. (Abs.).

Rothrock,C. S. 2015. Role of Seedling Diseases and the Efficacy of Fungicide Seed Treatments in Stand Establishment of Cotton. University of Arkansas.

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.

Shankarappa, T. H. and A. R. Madhav Rao. 1998. Characterization and Identification of Azotobacter strains Isolated. from Mulberry rhizosphere soil. In: Biofertilizers and Biopesticiders. Deshmukh , A.M.. India. 1: 1-3.

Shankarappa, T. H. and A. R. Madhav Rao. 1998 .Characterization and Identification of Azotobacter strains Isolated. from Mulberry Rhizosphere Soil. In : Biofertilizers and Biopesticiders. Deshmukh, A.M.. India. 1: 1-3.

Sharon, M. May 2010. Evalution Of Systemic Plant Protection Mechanism Indused by hypovirulent *Rhizoctonia* SPP. Thesis submitted for the degree – doctor of phil osophy,Submitted to the senate of Tel Aviv University. 7 pp.

Siameto, E. N., S. Okoth, N. O. Amugune, and N. C. Chege. 2011. Molecular characterization and identi fication of biocontrol isolates of Trichoderma harzianum from Embu District, Kenya. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 13:81-90.

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.

Taylor, R.J., B. Salas, G.A.Secor, V.Rivera and N.C.Gudmestad.2002. sensitivity of nort American isolates of *phytopthora erythroseptica* and *pythiym ultimum* to mefonoxam (metalaxyl). Plant disease. 86: 797 – 802.

Tchan, Y. T. and N. B. Peter. 1984. Genus Azotobacter. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Sneath, P.H., Mair, N.S. Sharpe, M.E. and Holt, J.G 1. William and Wilkins :p.219-229.

Thompson, J. P. and V. B. D. Skerman. 1979. Azotobacteraceae the taxonomy and ecology of aerobic nitrogen-fixing bacteria. Academic Press, London. 419 pp.

Van-Etten, H., D.P. Maxwell, and R. Bateman, 1967. Lesion maturation. fungal development, and distribution of endopolygalacturonase and cellulose in

*Rhizoctonia solani* infected bean hypocotyls tissues. Phytopathology. 57: 121-126.

Wyllie, T.D. 1962. Effect of metabolic byproducts of *Rhizoctonia solani* on the root of Chippewa soybean seedling. phytopathology. 52: 202-206.

Yasari, E., Patwardhan, A.M. 2007. Effects of *Azotobacter* and *Azospirillium* inoculations and chemical fertilizers on growth and productivity of Canola. Asi. J. Plant. Sci., 6(1), 77-82.

Zehender, G., J. Murphy , E. Sikora and J. Kloepper. 2001. Aplication rhizobacteria for induced resistance. European Journal Plant Pathology. 107:39-50. (Abs.).