كفاءة استعمال العامل الاحيائي *Trichoderma harzianum* Rifai والبكتريا المشجعة لنموالجذور والمستحضر الحيوي EM-1 ضد الفطر *Macrophomia phaseolina* (Tassi) Goid مسبب مرض التعفن الفحمي على زهرة الشمس

زيد طالب شمران* **عهد عبد علي هادي مطلوب**

جامعة الفرات الاوسط التقنية/ الكلية التقنية المسيب-قسم تقنيات /المقاومة الاحيائية/ ahad_20071980@yahoo.com

المستخلص

اجريت هذه الدراسة بهدف مسح مرض التعفن الفحمي على زهرة الشمس وتشخيص المسبب المرضي للاصابة وتقييم كفاءة بعض العوامل الاحيائية في مكافحتها واجراء التكامل بينهما، بينت نتائج العزل والتشخيص ان الفطر *Macrophomina phaseolina* الاكثر ظهوراً في15 حقلاً مزروع بنبات زهرة الشمس تابعة لمحافظة بابل بمعدل تكرار 83.3 % و تم الحصول على 15عزلة منه، شخصت بالاعتماد على تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)Polymerase Chain Reaction لتشخيص عزلات الفطر باستخدام البادئ الخاص به *M.phKFI – M.phKRI*، بينت نتائج الاختبار الاولي للمقدرة الامراضية لعزلات الفطر *M. phaseolina* باستخدام بذور الفجل ان جميع العزلات المختبرة احدثت انخفاضاً معنوياً بنسبة انبات البذور، وسببت العزلات انخفاضاً معنوياً في نسبة انبات بذور زهرة الشمس بلغ اقصاها عند العزله Mp-11 بواقع6.67%، اظهرت نتائج عزل وتشخيص كل من البكتريا *Azotobacter chroococcum* و*Azospirillum brasilense* التي عزلت من جذور ومنطقة حول الجذور لنباتات الحنطة في ثلاث مناطق في بابل الحصول على ثلاث عزلات لكل بكتريا، تم تشخيصها اعتماداً على الخصائص المظهرية والمجهرية والكيموحيوية، اظهرت النتائج قدرة العزلات الثلاثة لكل بكتريا على تثبيط الفطر الممرض حيث تمكنت العزلتين Ab-3 ، Ac-3 من منع نمو الفطر الممرض بالكامل، وتباينت نسبة تثبيطها باختلاف التخافيف المستعملة.اتضح من نتائج دراسة الفطر الاحيائي *Trichoderma harzianum* (T-22) قدرتها التثبيطية العالية، اذ بلغت100% في تثبيط الفطر *M. phaseolina* والتي لم تقل كفاءه عن القدرة التثبيطية للمستحضر الحيوي EM-1 التي بغلت عندها 100% ايضاً. واظهرت نتائج الظلة الخشبية ان معاملة التكامل بين العامل الاحيائي *T.harzianum* والبكتريا المشجعة للنمو (PGPR) *A. chroococcum* والبكتريا *A. brasilense* والمستحضر الحيوي EM-1 حققت اعلى نسبة خفض في نسبة وشدة الاصابه بمرض التعفن الفحمي على زهرة الشمس، كما ادت جميع المعاملات المستعمل بها العوامل الاحيائية الى رفع معنوي لمعايير النمو قياساً بمعاملة الفطر الممرض بمفرده. هذه الدراسات تعد اول اشارة في العراق لفعالية البكتريا *A. chroococcum* و *A. brasilense* والمستحضر EM-1 ضد الفطر الممرض *Macrophomina phaseolina* مسبب مرض التعفن الفحمي على زهرة الشمس.

الكلمات المفتاحية: التعفن الفحمي، العوامل الاحيائية،*Macrophomina phaseolina* ، زهرة الشمس، *A. chroococcum* ، المستحضر الحيوي EM-1، *A. brasilense*.

Efficiency of using biological factor *Trichoderma harzianum* , root growth promoting bacteria and bioformula EM-1 against *Macrophomina phaseolina* fungus causing of charcoal rot disease of sunflower

Abstract

This study was conducted in order to survey charcoal rot disease of sunflower and diagnose fungi that cause infection and evaluating the efficiency of some biological factors in the control and integration between them under a lath house, isolation and diagnosis showed that The fungus *Macrophomina phaseolina* was the most visible one in 15 fields planted with sunflower belong to Babylon province at the rate of recurrence about 83.3%,obtained on 15 isolates of *M. phaseolina* depending on technology of the PCR to diagnose the isolates of *M. phaseolina* by using primer which is M.phKF – M.phKR, The first test results of the pathogenicity of *M. phaseolina* studied using radish seeds showed that all tested isolates caused a significant reduction in the percentage of seeds germination also All isolates of *M. phaseolina* caused a significant reduction in the germination percentage of sunflower seeds, ranging from 6.67% by Mp-11, The results of isolating and diagnosing for bacteria *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasilense* showed, obtained 3isolatesisolated from three areas in Babylon from roots and Rhizosphere areas of wheat plant and they have been diagnosed depending on morphological, microscopic, and biochemical characteristics. The results of these isolates showed the ability to inhibit pathogenic *M. phaseolina* and they varied in the percentage of inhibition amounting to 100% by Ac-3 and Ab-3 isolates of

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

bacteria respectively, and the percentage of their inhibition varied depending on the applied dilutions, It was clear from the results of the study that *Trichoderma harzianum*(T-22)has ability to inhibited fungus *M. phaseolina* for percentage 100% (it reached the inhibition of the first-class rate). That thing happened also with EM-1 which inhibited same fungus with same percentage, The results of lath house experience showed that all treatments integration between the bacteria (PGPR)*A. chroococcum*, fungus *T.harzianum*, bacteria *A.brasilense* and EM-1 added to the contaminated soil with pathogenic fungus leads to the reduction of the percentage and the severity of infection with the charcoal rot disease of sunflower roots. All the treatments that used biogenic factors led to a significance increasing in the growth of sunflower compared to the treatment of the pathogenic fungus alone. this study showed for the first time in Iraq the efficiency of *A. chroococcum* , *A.brasilense* and EM-1 bioformula against of *M. Phaseolina* fungus causing agent of charcoal rot disease of sunflower.

Key words: Charcoal rot, sunflower, *Macrophomina phaseolina*, Bacteria, Bio-formula,EM-1.

المقدمـــة

يعد نبات زهرة الشمس *Helianthus annuus L.* من المحاصيل الزيتية الصيفية الحولية التابعة للعائلة النجمية *Asteraceae* (Pope واخرون، 2001)، ويعد المحصول ثالث اهم مصدر للزيت النباتي في العالم اذ يساهم بمقدار 14% من الانتاج العالمي، وتحوي بذوره على نسبة عالية من الزيت تتراوح في بعض الهجن والاصناف المتوافرة بشكل تجاري بين 39 - 49% (Putnam واخرون، 2008)، قدرت المساحة المزروعة بمحصول زهرة الشمس عالميا 22.8 مليون هكتار، والانتاج العالمي 52.1 مليون طن بمعدل 2.287 طن\ هكتار (F.A.O.، 2007). اما في العراق فقد بلغت المساحة المزروعة بنبات زهرة الشمس 7.6 الف دونم والانتاجية 3.7 الف طنً (المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 2013).تصاب نباتات زهرة الشمس بالعديد من الافات الزراعية كالحشرات والمسببات المرضية ويعتبرمرض التعفن الفحمي charcoal rot disease والمتسبب عن الفطر الممرض *Goid* (Tassi) *Macrophomina phaseolina* أهم الأمراض والعوامل المحددة لهذا المحصول، (Schnieder واخرون،2001). أن الأصابة بهذا المرض تؤدي إلى خسائرأقتصادية كبيرة لهذا المحصول فقد ذكر Wrather واخرون(1998) أن الخسائر الناجمة من الإصابة بهذا المرض في الولايات المتحدة والبرازيل وكندا والأرجنتين والبرغواي بلغت 272.22 مليون دولارعام1994. وفي دراسة قام بها فياض واخرون (2009) في العراق بين أن الإصابة بالفطر*M.phaseolina* أدى إلى انخفاض كبيرفي معدل حاصل النبات الواحد والنسبة المئوية للزيت. يعدالفطر *M. phaseolina* من الفطريات الممرضة المستوطنة في التربة ذات المدى العائلي الواسع والذي يضم أكثرمن 500 نوع نباتي (Chamorroواخرون،2015) كماوجد أن الإصابة بهذا المرض تزداد كلما تعرض النبات لعوامل الأجهاد البيئي كأرتفاع درجات الحرارة وقلة الرطوبة (Almeidaواخرون، 2003). ولغرض السيطرة على هذا المرض استعملت طرائق مكافحة مختلفة كالدورات الزراعية والبسترة الشمسية إلا انها لم تكن فعالة في معظم الاحيان بسبب المدى العائلي الواسع للفطر والى قابلية الفطر العالية على البقاء في التربة لفترة قد تصل الى ثلاث سنوات (Pope واخرون، 2001 ؛ فياض واخرون، 2009). وان استعمال الطرق الكيمياوية لمكافحة امراض النبات لا يمكن عدها حلا استراتيجيا اذ ادى استعمالها الى الكثير من المشاكل البيئية والصحية والاختلال بالتوازن الطبيعي للاحياء، وفقدان الكثير منها الى تاثيرها الفعال بسبب تطور سلالات جديدة من المسببات المرضية المتحملة لهذه الكيميائيات (Andersson واخرون، 2014 وJohnson وLynne، 2015). ومع اتجاه العالم نحو تقانات الزراعة النظيفة مع التقليل قدر ما امكن من التلوث ومن ثم استخدام مواد طبيعية كالاسمدة العضوية و الحيوية 0 بديلاً مناسباً عن الاسمدة الكيميائية (Gill، 2014). نالت المكافحة الاحيائية للمسببات المرضية في العقود الاخيرة اهتماما واسعا باستعمال بعض الاحياء المضادة كالفطريات والبكتريا لمكافحة الكائنات الممرضة ومن بين تلك الاحياء الانواع العائدة للجنس *Trichoderma* النوع *T. harzianum* (Harman، 2006 و Singh واخرون، 2014). تعد البكتريا *Azotobacter chroococcum* و *Azospirillum brasilense* من اكثر انواع البكتريا الحرة المعيشة المثبتة للنتروجين كفاءة في تحسين نمو النبات، اذ اشارت البحوث الى انه يمكن عزل بحدود 100سلالة بكتيرية مثبتة للنتروجين من منطقة حول الجذور Rhizosphere غير ان هذه الانواع تعد اكثرها كفاءة في التثبيت (Howell، 2006 و Sharma، 2014). كما تعملان على تحسين نمو النبات من خلال افراز بعض الهرمونات والانزيمات والفيتامينات ومنظمات النمومما ينعكس ايجابيا على حالة نمو النبات وزيادة انتاجيته (Faruq واخرون، 2015). ومن الجدير بالذكر ان حالة التداخل بين بكتريا *A. chroococcum* و الفطر *T.harzianum* هي من النوع الايجابي، فوجود هذه الاحياء الدقيقة مع بعضها في التربة كان ذا تاثير ايجابي ومحفز لنمو النبات (فرج، 2012). اشارت دراسة سابقة الى كفاءة المستحضر الحيوي EM-1 ضد المسببات المرضية الفطرية

والبكتيرية نظرا لما يحويه هذا المستحضر من احياء مجهرية تنافس المسبب المرضي و تنتج اثناء نموها مواد مضادة للفطريات و مركبات ايض ثانوية ومنظمات نمو تساعد في تحسين النمو وتثبط نمو المسببات المرضية، كما ان لها دورا في تحفيز المقاومة الجهازية للنبات ضد العديد من المسببات الممرضة (الجراح والعاني، 2012 و Nia، 2015). ونظراً لاهمية مرض التعفن الفحمي على نبات زهرة الشمس ولقلة الدراسات عليه وكمحاولة لادخال برامج مكافحة احيائية تواكب التوجهات الزراعية الحديثة هدفت الدراسة الى مسح مرض التعفن الفحمي على نبات زهرة الشمس في بعض حقول محافظة بابل وعزل وتشخيص المسبب المرضي واختبار مقدرته الامراضية وعزل وتشخيص البكتريا المحفزة لنمو الجذور *Azotobacter chroococcum* و *Azospirillum brasilense* من الترب الزراعية وتقويم فاعليتها التضادية ضد الفطر الممرض وتقييم فاعلية بعض العوامل الاحيائية ومستحضر الاحياء الدقيقة EM-1 ضد مسبب التعفن الفحمي على زهرة الشمس.

2– المـواد وطرائـق العمــل

1-2 عزل وتشخيص الفطر *Macrophomina phaseolina*

عُزل الفطر *M. phaseolina* من نباتات زهرة الشمس ضمن المناطق المدروسة (البدع،السدة، المسيب، الحصن، المحاويل، المشروع، الكفل، الطهمازية،القاسم، الجيلاوية، النيل، الوطيفية، جبلة، المنصوري وابوالجاسم)،أُخذت اجزاء من الجذور وقواعد السيقان التي ظهرت عليها اعراض التعفن الفحمي مع وجود الاجسام الحجرية في لب وقشرة النبات، غسلت بالماء الجاري لمدة 30 دقيقة، قطعت الى اجزاء بطول 0.5 سم وعقمت سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم (1% كلور حر) لمدة 3دقائق بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم لمدة 2 دقيقة، نشفت بورق الترشيح المعقم ونقلت بواسطة ملقط معقم بواقع 4 قطع نباتية لكل طبق بتري بقطر 9 سم حاويةعلى الوسط الزرعي PDA المـضاف اليه المـضاد الحيوي Chloramphenicol بتركيز 200 ملغم / لتر ثم حضنت الاطــباق في درجة حرارة 25±1 مº لمدة 3ايام.

2-2 التشخيص الجزيئي:-

1-2-2 الخصائص الجزيئية

تم تنفيذ هذه الدراسة في مختبر ابحاث الوراثة لقسم علوم الحياة/ كلية العلوم للبنات/جامعة بابل.

جدول1. بعض الصفات الخاصة بالبادئ primer التي تم استخدامها للكشف عن الفطر*Macrophomina phaseolina*

حجم الحزمة التي تنتجه (bp)	تسلسل النيوكليوتيدات من′5 الى ′3	اسم البادئ	اسم الفطر
350	5-CCGCCAGAGGACTATCAAAC-3	M.phKF	*M. phaseolina*
	5-CGTCCGAAGCGAGGTGTATT-3	M.phKR	

- **طرائق العمل الخاصة بتقنية الـ PCR**

اولا: استخلاص الحامض النووي DNA وتنقيته

تم استخدام 15عزلة من الفطر *Macrophomina phaseolina*والتي سبق عزلها من جذور وقواعد سيقان نبات زهرة الشمس المصابة من محافظة بابل ، اذ استخدم Kit خاص بالاستخلاص من شركة Geneaid (Reagent Genomic DNA Kit)، نميت هذة العزلات على الوسط الزرعي Potato Dextrose Brothلمدة 7 ايام وحضنت على درجة حرارة25±1 مº تم بعدها ترشيح الغزل الفطري بواسطة ورق الترشيح بعد التخلص من الوسط المغذي، وضع الغزل الفطري المرشح داخل hood لغرض تجفيف العينة والتخلص من الرطوبة الزائدة للحصول على كثافة كبيرة من الغزل الفطري، نقلت كمية منه الى انبوب ابندروف (Eppendroffe tube) حاوية على 293µ من محلول EDTA الموضوع درجة حراره 65 مº ثم سُحق بواسطة عيدان خشبية ،اضيفµl 7.5من 20 ملغم/مل انزيم Lyticase مع التحريك لغرض المزج، حُضنت العينات بدرجة حرارة 37 °م لمدة 30-60 دقيقة لكي يقوم الانزيم بتحطيم الجدار الخلوي، ثم بُردت الى درجة حرارة الغرفة، طُردت مركزياً لمدة دقيقتين بسرعة 13000-16000 دورة/دقيقة وازيل الرائق (Supernatant) ثم اضيف l 300µ من محلول التحلل Cell Lysis Buffer الى كل انبوبة ابندروف الحاوية على الراسب الفطري وحركت بلطف لغرض المزج بعدهاحضنت لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 60°م مع التقليب المستمر كل 3 دقائق، اضيف 5 µl من انزيم التحطيم ال RNase ثم حضنت لمدة 5 دقائق، اضيف 100µl من محلول ترسيب البروتينات Protein Removal Buffer، مُزجت الانابيب جيداً بواسطة المازج الكهربائي Vortex mix لمدة 10 ثانية، تُركت العينات على الثلج لمدة خمس دقائق، نبذت مركزياً بسرعة 16000-14000 دورة/دقيقة لمدة ثلاث دقائق، نُقل الرائق الحاوي على DNAالمستخلص بواسطة ماصة دقيقة الى انابيب ابندروف نظيفة ومعقمة حاوية على300 µl من الايزوبروبانول بدرجة حرارة الغرفة، حُركت الانابيب بلطف عدة مرات لحين ظهور الـDNA بشكل تركيب يشبه الخيط، نُبذت مركزيا بسرعة 14000-16000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين، ازيل الرائق برفق وقُلبت الانابيب على ورقة نشاف معقمة. اضيف 300µl بدرجة حرارة الغرفة من 70% ايثانول وقُلبت الانابيب بلطف عدة مرات لغسل الـDNA المترسب، نُبذت مركزيا بسرعة 16000-14000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين، ثم ازيل الايثانول برفق،

قُلبت الانابيب على ورقة نشاف معقمة لمدة 10-15 دقيقة لغرض تجفيف الراسب، اضيف50-100 µl من محلول(TEB) Tris-Borate EDTA buffer وحضن على درجة حرارة 60°م لمدة 30-60 دقيقة، اذا لم يُنجز التضخيم في نفس يوم الاستخلاص تُحفظ النماذج جاهزة بدرجة حرارة2-8°م.

ثانيا: الكشف عن الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA)

استخدمت طريقة الترحيل الكهربائي Electrophoresisباستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1% للكشف عن DNA باستخدام المحاليل TBE buffer, Bromophenol blue, Ethidium bromide ,Agaroseوحسب طريقة (Sambrook واخرون،2001).

ثالثا: طريقة عمل تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase (PCR) Chain Reaction

استخدمت تقنية الـPCR لتضخيم مناطق التفاعل باستخدام البادئ المذكور في الجدول (1). اجريت طريقة العمل بحجم20 µl وكما موضح في الجدول (2) اعتماداً على النشرة المرفقة في Master Mix المصنع من شركة Bioneer بانبوبة الـــ PCR. بعد اتمام الاضافات جميعها مُزجت العينات مركزيا بوساطة جهاز الطرد المركزي الخاص بانابيبPCR ونقلت العينات الى جهاز الـPCR من نوع Cycler Eppendorf Master (Hambrug,Germany)

جدول 2.احجام المواد الكيمياوية المستخدمة في تفاعلPCR

المواد الكيميائية	الحجم
Master Mix	5 µl
Primer forward	2.5 µl
Primer ReveR.s	2.5 µl
DNA	5 µl
Nuclease Free Water	اكمل الحجم الى20 µl
Total	20 µl

واجري تفاعل تضخيم سلاسل DNA عزلات *Macrophomina phaseolina*اعتماداً على البرنامج الموصوف من قبل (Babu واخرون ,2007) كما في الجدول(3).

جدول3. برنامج عمل جهاز PCR الخاص بالبادئ المخصص للفطر*M. phaseolina*

رقم الخطوة	الخطوات	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
1	Initial Denaturation	95مْ	2 min	1
2	Denaturation	95 مْ	30 Sec.	25
3	Annealing	56 مْ	1 min	
4	Extension	72 مْ	2 min	
5	Final extension	72 مْ	10 min	1

2-3اختبار القدرة الامراضية لعزلات الفطر *Macrophomina phaseolina* باستعمال بذور الفجل على الوسط الزرعي Water Agar

تم اختبار القدرة الامراضية لعزلات الفطر *M. phaseolina*وذلك حسب طريقة Bolkan و Butler (1974) حيث حُضرت اطباق بتري قطرها 9 سم تحوي الوسط الزرعي Water Agar (20غم Agar، 1 لتر ماء مقطر) والمعقم بجهاز المؤصدة لمدة 15 دقيقة والمضاف له المضاد الحيوي، تم تلقيح الاطباق في مركزها بقرص قطر 0.5 سم من مزارع عزلات الفطر ولحين وصول الغزل الفطري الى منتصف قطر الطبق، زرعت بذور الفجل محلية معقمة سطحياً بمحلول هايبوكلورات الصوديوم وبصورة دائرية قرب حافة الطبق وبمعدل 25 بذرة / طبق. استعملت 3اطباق لكل عزلة كمكررات وتركت معاملة المقارنة من دون الفطر، وضعت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 25±1 مº ثم اخذت النتائج بعد 7 ايام وذلك بحساب نسبة الانبات وحسب المعادلة الاتية:% للانبات = عدد البذور النابتة /العدد الكلي للبذور × 100

اختبرت القدرة الامراضية لعزلات الفطر الممرض بعدما انتخبت العزلات الاكثر امراضية(العطيفية، ابو الجاسم، السدة، الحصن، النيل)على بذور نبات زهرة الشمس تحت ظروف الظلة الخشبية وحساب نسبة الانبات حسب المعادله اعلاه.

2-4.عزل وتشخيص البكتريا المشجعة لنمو جذور النبات Plant Growth promoting Rizobacteria (PGPR)

2-4-1. عـزل وتشـخيص البكتريـا*Azotobacter chroococcum*

عزلت البكتريا من حقول حنطة في ثلاث مناطق (مشروع المسيب، القاسم، المحاويل) من خلال تحضير تخافيف لعينات التربة وذلك باضافة 10غم من عينات التربة المختارة الى 90مل من الماء المقطر المعقم في دوارق سعة 250 مل ومزجت جيدا و اجريت تخافيف متسلسلة والى حد 10^{-6} وذلك بنقل 1مل من عالق التربة الى انابيب اختبار تحتوي 9مل من الماء المقطر المعقم ولكل عينة من عينات التربة واستعمل وسط Sucrose Mineral Salts (SMS) لتلقيح تخافيف التربة (Becking , 1981) ثم حضنت الانابيب على درجة حرارة 28° م ولمدة 2-3 ايام وفحصت الانابيب بملاحظة الغشاء البني المتكون على السطح والذي يعد مؤشرا لنمو البكتريا *Azotobacter* sp. ،ثم اخذ جزء من اللقاح بواسطة الناقل المعقم من الانابيب التي اعطت مؤشرا للنمو ونشرت على سطح طبق بتري يحتوي على الوسط الصلب Sucrose Mineral Salts Agar (SMSA) وحضنت الاطباق على درجة حرارة 28ْم ولمدة2-3 ايام، ثم اعيد التخطيط لثلاث مرات متتالية وذلك بأخذ اللقاح بواسطة الناقل loop معقم من حافة المستعمرة لغرض الحصول على مستعمرات نقية من البكتريا. تم تنشيط العزلات باستعمال الوسط الموصوف من قبل Thompson و Skerman (1979) بعدها تم تشخيص بكتريا *A.chroococcum* بالاعتماد على الصفات الزرعية والصفات المجهرية و اختبار الحركة (Black، 1965). بالاضافة الى الصفات الكيموحيوية مثل النمو في 1% كلوريد الصوديوم و النمو في 0.1% فينول وحسب ما اشار اليه Tchan و Peter (1984) و النمو في حرارة 37°م والنمو في الكليسيرول كمصدر وحيد للكاربون (Thompson و Skerman، 1979) .و تم اختبار النمو في وسط بيرك (Burk"s media)(Allen،1959)،وقابلية البكتريا على استهلاك المصادر الكاربونية المختلفة (Shankarappa واخرون، 1998)**.**كما اختبرت قدرة العزلات على تثبيت النتروجين الجوي وتقديره بجهاز Microkildahl والموضح من قبل Bremner (1965).

2-4-2.عزل بكتريا *Azospirillum brasilense*

تم عزل البكتريا من حقول حنطة في ثلاث مناطق (مشروع المسيب، القاسم، المحاويل) من منطقة انسجة الجذورالداخلية تم اخذ 10 غم من كل عينة من عينات الجذور المغسولة جيدا وعقمت سطحياً بوضعها في محلول1% chloramine.T ولمدة ساعة، ثم غسلت الجذور خمس مرات بالماء المقطرالمعقم وتركت فيه لمدة 30 دقيقة مع التحريك المستمر لازالة كل ما علق بها من المحلول المعقم. بعدها هرست الجذور جيدا باستعمال هاون خزفي معقم بالكحول مع قليل من الماء المقطر والمعقم ثم اكملت كمية الماء تدريجيا الى 90 مل للحصول على التخفيف الاول 10^{-1} ومنه عملت التخافيف الاخرى ولغاية 10^{-7} وحسب طريقة Baldani و (1980) Doberiner، ثم نقل 1 مل من التخافيف المطلوبة الى انابيب حاوية على 9 مل من الوسط الزرعي شبه الصلب الخال من النتروجين Nitrogen-Free Broth (Nfb) والمعقم بالمؤصدة على درجة حرارة 121°م ولمدة 15 دقيقة وبواقع مكررين لكل تخفيف، وحضنت الانابيب على درجة 30ْم ولمدة 48 ساعة وبحسب طريقة Krieg و Dobereiner (1984) ويعد ظهور النمو الحلقي (pellicle) الابيض اللون على بعد 1-4 ملم اسفل السطح بعد 24 ساعة والذي يرتفع للاعلى باتجاه السطح بحيث يصبح تحت السطح بمسافة 2 ملم بعد 48 ساعة وهذا يؤخذ كنتيجة موجبة لوجود بكتريا *Azospirillum* sp.، وعند فحصها بالمجهر تظهر بشكل خلايا عصوية سريعة الحركة(Dobereiner وDay، 1976). وبعد ظهور النمو الحلقي اجريت ثلاث نقلات متتالية على الوسط السائل نفسه انفاً ثم نقيت البكتريا بنقل النمو الظاهر باستعمال الناقل loop معقم الى الاطباق الحاوية على وسط Rogo Congo(RC) المضاف اليه صبغة الكونغو الحمراء وزرعت بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق على درجة 37ْم ولمدة 72 ساعة وحسب طريقة Rodriguez-Caceres (1982). وبعد ظهور المستعمرات الصغيرة القرمزية اللون على الوسط نقيت كل مستعمرة باعادة تخطيطها ثلاث مرات بنقل اللقاح البكتيري بواسطة ناقل loopمعقم على الوسط نفسه للتاكد من نقاوتها وملاحظة اشكال المستعمرات، بعدها تم تشخيص بكتريا*Azospirillum brasilense* بالاعتماد على الصفات الزرعية (Tarrand واخرون، 1978)والمجهرية (Black، 1965).

2-5. اختبار الفعالية التضادية للبكتريا PGPR في تثبيط نمو الفطر الممرض*M.phaseolina*تحت الظروف المختبرية

اختبرت القابلية التضادية لثلاث عزلات(مشروع المسيب، القاسم، المحاويل) لكل من البكتريا المثبتة للنيتروجين *Azotobacter chroococcum* و *Azospirillum brasilense* لتحديد أي العزلات هي اكفأ ضد الفطر الممرض *M. phaseolina* على الوسط الزرعيPDA(الخالي من المضاد الحيوي)باضافة 1 مل من عالق كل بكتيري المنماة على وسط التنشيط السائل بعمر 5 أيام في الطبق مع تحريكة حركة رحوية لتوزيع اللقاح بصورة متجانسة قبل اضافة قرص بقطر 0.5 سم من مزرعة الفطر الممرض في مركزة و بواقع ثلاث مكررات لكل جنس مع ترك ثلاث مكررات مقارنة من دون عالق بكتيري (الفطر الممرض بمفرده مع 1 مل ماء مقطر). ثم بعد اكتمال نمو الفطر في معاملة المقارنة تم حساب معدل نمو الفطريات الممرضة والنسبة المئوية للتثبيط حسب المعادلة اللآتية:

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

2-6. قياس الفعالية التضادية للفطر *Trichoderma harzianum* ضد الفطر *M.phaseolina* على الوسط PDA

تم اختبار القدرة التضادية للعامل الاحيائي *T. harzianum* (تم الحصول عليه من الدكتور حسام الدين كلية الزراعة/جامعة بغداد) مع عزلة الفطر الممرض Mp-11حسب طريقة الزرع المزدوج على الوسط PDA،اذ قسم طبق بتري قطره 9 سم حاوٍ على الوسط الزرعي PDA بخط وهمي الى قسمين متساويين، لقح مركز القسم الاول من الطبق بقرص 5 ملم من مستعمرة الفطر الممرض بعمر 7ايام ، لقح القسم الاخر من الطبق بقرص مماثل من مزرعة الفطر *T. harzianum* وتم وضع قرص من الفطر الممرض في مركز احد الاقسام في الطبق كمقارنة نفذت التجربة بواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة وضعت الاطباق في حاضنة تحت درجة حرارة25±1 م^{o} لمدة اسبوع واحد وقد تم تقدير القدرة التضادية حسب مقياس Bell واخرون (1982) والمكون من خمس درجات، الفطر الذي يمتلك قدرة تطفلية من الدرجة الثانية او اقل يعد ذو قدرة تطفلية عالية. كما تم تصوير عملية التضاد والتطفل الفطري بواسطة المجهر الالكتروني بطريقة المسح Scanning Electron Microscope (SEM) في وحدة المجهر الاكتروني /كلية العلوم/ جامعة الكوفه، وباستعمال طريقة التفريغ الهوائي لكون هذه العينة بايولوجية و تحتوي على الماء لذا يجب تجفيفها، ومن دون استخدام مواد كيميائة مثبته للعينة، لان ذلك سيغيرشكل العينة (Goldstein واخرون، 2003و Patrick، 2009).

2-7 تحضير المخصب الحيوي Effective microorganisms(EM-1) واختبار فعاليته التضادية ضد الفطر الممرض *M. phaseolina*

تم تفعيل محلول EM-1 الاساسي الخامل (شركة Emakanpazir parsالايرانية) بخلطه مع مولاس وماء معقم خال من الكلور بنسبة 95:5:5 على التوالي في دورق زجاجي وغلقت فوهته و وضع مكان دافيء بعيداً عن اشعة الشمس لمدة 10 ايام بدرجة حرارة 35-40 مْ وتم اجراء تهوية كل 3 ايام،بعدها لوحظ وجود القطعة المترسبه في اسفل الوعاء وهي دليل على جاهزية المستحضرللاستعمال(الجراح، 2011 و الكيم، 2015). اضيف 1 مل من محلول EM-1 المفعل الى اطباق بتري حاوي على وسط PDA وحركت الاطباق حركة رحوية ثم لقحت بقرص قطر 0.5 سم من عزلات ممرضة للفطر *M. phaseolina* بعمر 5 أيام في مركز الطبق بواقع 3 مكررات مع تنفيذ معاملة مقارنة وذلك بتلقيح مركز الطبق بعزلات الفطر *M.phaseolina* فقط، وضعت الأطباق في الحاضنة في درجة حرارة (25±1 مْ) لمدة 7 أيام(castroواخرون، 1995) وتم قياس قطر المستعمرة والنسبة المئوية للتثبيط على أساس معاملة المقارنة لتقييم كفاءة المستحضر EM1.

2-8 تقييم فاعلية بعض العوامل الاحيائية ومستحضر الاحياء المجهرية EM-1 والمبيد الكيمائي Beltanol في حماية نبات زهرة الشمس من الاصابة بالفطر*M.phaseolina* مسبب مرض التعفن الفحمي تحت ظروف الظلة الخشبية

نفذت التجربة في الظلة الخشبية (الكلية التقنية /المسيب) بتاريخ 2015/3/31، عقمت تربة مزيجية بجهاز المؤصدة في درجة حرارة 121مْ وضغط 1.5كغم/سم^{2} ولمدة ساعة واحدة وتركت 7 ايام قبل الاستعمال، بعدها وزعت في أصص بلاستيكية قطر 12.5 سم وبمعدل 1 كغم/أصيص. تمت إضافة معاملات التجربة التي شملت مايأتي:**1**- الفطر الممرض بمفرده *M. phaseolina*. **2** -*M. phaseolina* + البكتريا *Azotobacter chroococcum* **3**- *M.phaseolina* + البكتريا *Azospirillum brasilense M.phaseolina*. **4**- + الفطر *T. harzianum*. **5**- *M.phaseolina*+ المستحضر EM-1 **6**- *M.phaseolina* + Beltanol. 7- *M.phaseolina*+*Azotobacter chroococcum*+ *T.harzianum* - *M.phaseolina* + *Azospirillum brasilense* + *T.harzianum* **9**- *M.phaseolina*+ EM-1+*T. harzianum*,**10**- *Azotobacter chroococcum*بمفردها **11**- *Azospirillum brasilense*بمفردها، **12**- *T.harzianum* بمفرده،**13**- EM-1 بمفرده **14**- *Azospirillum brasilense*+ *T.harzianum* **15**- *Azotobacter chroococcum*+ *T.harzianum* **16**- *T.harzianum*+EM-1، **17**- مقارنة (نبات فقط بدون اي اضافة). كررت كل معاملة 3 مكررات و نفذت التجربة باستخدام التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (C.R.D.)، اذ أضيف عالق البكتريا *Azotobacter chroococcum* و*Azospirillum brasilense*الى التربة بمعدل 10 مل/أصيص قبل زراعة البذور مباشرة، كما تمت إضافة لقاح الفطر*T. harzianum*محملاً على بذور الدخن وبمعدل 10 غم / أصيص قبل 5 أيام من الزراعة (Sallam واخرون، 2008)، أما معاملة المستحضر الحيوي EM-1 فقد أضيف بعد تفعيله بمعدل 25 مل / أصيص قبل خمسة أيام من إضافة الفطر الممرض، بينما أضيف لقاح الفطر الممرض محملاً على بذور الدخن المحلي قبل الزراعة بنسبة 1% (وزن/وزن) إلى جميع المعاملات التي تتطلب ذلك. في حين أضيف المبيد الكيميائي Beltanol بتركيز 1 مل/لتر وذلك بعد يوم واحد من إضافة الفطر الممرض (الجبوري، 2002 و حسون، 2005). زرعت الأصص ببذور لنبات زهرة الشمس صنف زهرة العراق بواقع 5 بذور/ اصيص وتمت متابعة التجربة وسقيها كلما دعت الحاجة، أخذت النتائج بعد مرور 50 يوم من اضافة المعملات.

2-9. التحليل الإحصائي

استعمل البرنامج الإحصائي Statistical Analysis System -SAS (2012) في تحليل البيانات لدراسة تأثير

المعاملات المختلفة في الصفات المدروسة وفق تصميم عشوائي كامل (CRD) فيما يخص الجزء المختبري ، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي (LSD).

3. النتائج والمناقشة

3-1.عزل وتشخيص المسبب المرضي لمرض التعفن الفحمي على زهرة الشمس:-

اظهرت النتائج (جدول4) الحصول على 15 عزلـه من الفطر *Macrophomina phaseolina* من جذور نباتات زهرة الشمس المصابة بمرض التعفن الفحمي والتي ظهرت عليها اعراض المرض المتمثلة باصفرار وذبول و جفاف النبات وتلون

جدول4 . الفطريات المرافقة على زهرة الشمس المصابة وأماكن وجودها ونسب تكرارها في العينات

اسم الفطر	رقم العينة**	% لتكرار الفطر في العينات*	
		اعلى نسبة	المعدل
***Aspergillus niger* Van Tieghe**	**15,14,11,6,5,3**	**75**	**22.6**
***Fusarium solani* (Mart.) Sacc**	**15,8,7,1**	**16.6**	**4.3**
***Rhizoctonia solani*Kuhn**	**12,11,10,4,2**	**33.3**	**15.5**
***Microphomena phaseolina* (Tassi) Goid**	**15-1**	**100**	**83.3**
***Tricoderma harzianum* Rifai**	**14,5,2**	**8.3**	**1.6**
***Penicillum* spp.**	**15,10,4**	**8.3**	**2.7**

* % لتكرار الفطر في العينة = عدد القطع النباتية التي ظهر فيها الفطر في الأطباق/ العدد الكلي للقطع المستعملة في العينة × 100

** الارقام تمثل مناطق جمع العينات (جدول 1)

قاعدة الساق بلون بني داكن يسود مع تقشر قاعدة الساق وظهور الاجسام الحجرية السوداء في قشرة ولب الساق سجل الفطر *M.phaseolina*(صوره 1) ظهوراً في كل المناطق وبمعدل 83.3، وتتفق النتائج مع ماوجده كل من فياض (2009) وIjaz واخرون (2012) وSantosو اخرون(2015) و Mehmet و Sarbesh(2016) من ان الفطر *M. Phaseolina* يعد المسبب المرضي للتعفن الفحمي على زهرة الشمس.

الصوره1. بعض الصفات المضهريه والمجهريه للفطر *M. phaseolina*

أ-الفطر *M. phaseolina* نامي على الوسط الزرعي PDA. ب-ظهور الاجسام الحجرية للفطر *M. phaseolina* على الوسط الزرعي PDA تحت المجهر الضوئي(×10). ج- الغزل الفطري تحت المجهر الضوئي (العدسه الزيتيه×100).

بينت نتائج العزل ظهور بعض الفطريات المرافقة لجذور زهرة الشمس المصابة مثل الفطر *Rhizoctonia solani* و *Aspergillus niger* وقد يعزى وجود هذاالنوع من الفطريات الى نموها وتغلغل غزلها الفطري داخل الانسجة النباتية المتحللة التي اصيبت سابقاً بالفطريات المسببة لتعفن الجذور مما وفر لها حماية من التعقيم السطحي, كما تم عزل الفطر *Trichoderma harzianum* ويعزى وجود هذا الفطر الى مقدرته على التطفل على الغزل الفطري للفطريات الممرضة داخل انسجة النبات مما جعله في مأمن من فعل المعقم السطحي (آل مراد واخرون، 2011).

3-2.التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *Macrophomina phaseolina*

3-2-1.عزل الحامض النووي DNA:

عزل DNA من خلايا 15 عزله منالفطر *M. phaseolina*المدروسة، و اظهرت النتائج(الجدول5) تركيز DNA المُستخلــص، اذ تــراوح بين 10.2 و 20.3 نانوكرام /مايكروليتر، بينت النتائج ان DNA المُستخلص من العزلات الفطريه كان بتراكيز كافية لاجراء تفاعل تضخيم السلسلة(Green و Sambrook، 2012).

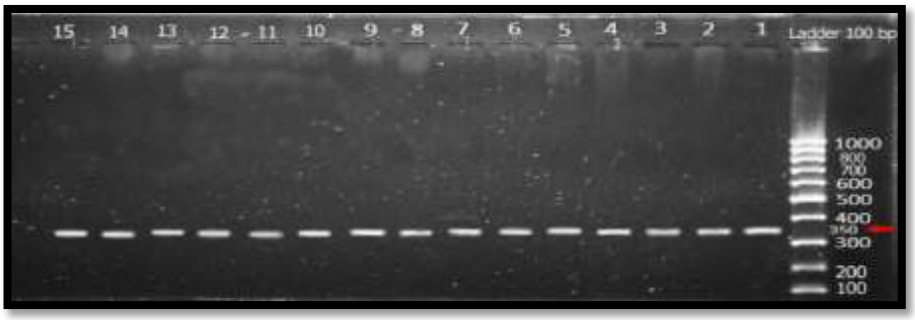
الجدول5. قيم التركيز في DNA المستخلص من عزلات الفطر *Macrophomina phaseolina*

رمز* العزلة	تركيزDNA نانوكرام /مايكروليتر	رمز العزلة	تركيزDNA نانوكرام /مايكروليتر
Mp-1	11.4	Mp-9	13.3
Mp-2	10.5	Mp-10	18.8
Mp-3	18.8	Mp-11	10.2
Mp-4	12.1	Mp-12	13.4
Mp-5	19.1	Mp-13	17.9
Mp-6	14.3	Mp-14	18.1
Mp-7	16.9	Mp-15	16.7
Mp-8	20.3		

M. phaseolina =Mp*

3-2-2.تفاعل تضخيم السلسلة Chain (PCR) ReactionPolymerase

اظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لتضخيم الحامض النووي DNA لعزلات الفطر *M.phaseolina* باستخدام الزوج البادئ التشخيصي M.phKF/M.phKR وبعد اجراء عملية الترحيل الكهربائي عليه، ظهرت حزم لجميع العزلات المستعملة في التفاعل بحجم bp 350، اذ تدل هذه النتيجة الى ان جميع هذه العزلات هي تابعة للفطر *M phaseolina*. كما هو مبين في الصورة (2). وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Babu واخرون (2007)و Santos واخرون (2015) من ان استعمال البادئ – M.phKF M.phKRالخاص بالفطر الممرض *M.phaseolina* اعطى حزمة لهذا التفاعل بحجم 350bp حيث قام Babu بعزل 50 عزله من الفطر *M.phaseolina* من عوائل مختلفة مصابه، وعن طريق البادئ التسلسلي المذكور اعلاه تم تحديد نوع الفطر.



صوره(2). الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لنواتج تضاعف الـDNA حيث تمثل الصورة عزلات الفطر *M. phaseolina* (1-15)

3-4.اختبـــــار القـــــدرة الامراضـــية لعـــــزلات الفطر*Macrophomina phaseolina*

3-4-1.الكشف عن العزلات الممرضة باستعمال بـــذور الفجل

احدثت جميع عزلات الفــطر*M. phaseolina* المختبره خفضاً مــعنوياً بنسبة انبات بذور الفجل اذ يوضح الجدول(6) أن جميع العزلات حققت تبايناً في القدرة الامراضية، إذ تفوقت العزلات -Mp, Mp-13 Mp-11 15,وMp-2 في خفض النسبة المئوية للإنبات التي كانت في مــعاملاتها 0% قياساً بمعاملة المقارنة التي كانت نسبة الانبات فيها 94.67%، وتتفق هذه النتائج مع ما وجده Ndiaye (2007) و Almomani (2013) و الكيف (2016) من ان معظم عزلات الفطر الممرض *M. phaseolina* المختبرة أحدثت خفضاً معنوياً بالنسبة المئوية لأنبات بذور الفجل في الوسط الزرعي W.A. قياساً بمعاملة المقارنة.ان سبب تباين عزلات الفطر الممرض في تاثيرها على النسبة المئوية لانبات بذور الفجل قد يعود الى الاختلاف الوراثي بين عزلات الفطر

جدول 6. الكشف عن العزلات الممرضة للفطر *M. phaseolina* باستعمال بذور الفجل

المعاملات*	نسبة الانبات (%)	المعاملات*	نسبة الانبات (%)
Mp-1	26.67	Mp-8	27.33
Mp-10	35.33	Mp-2	0.00
Mp-7	12.00	Mp-6	37.33
Mp-3	33.33	Mp-13	0.00
Mp-12	6.67	Mp-11	0.00
Mp-14	16.67	Mp-4	34.67
Mp-5	14.00	Mp-9	18.00
Mp-15	0.00	المقارنة	94.67
LSD (0.05) =3.256			

*العدد بجانب الرمز يمثل رقم العزلة، Mp= *M. phaseolina* التي جمعت من مناطق مختلفة و اختلاف العزلات في مقدرتها على افرازالمركبات الايضية الثانوية السامة التي تحدث قتلاً للاجنة مثل السم Asperlin و Isoasperlin و phomalactone و Phaseolinicacid و phomeno بالاضافة الى افرازالانزيمات المحللة للبكتين والسيليلوز في المراحل الاولى من الاصابة وهذه الانزيمات تؤدي دوراً في اختراق العائل ومنها Pectinase، Pectinmethylesterase، Pectinlyase، Cellulase و Phosphatase والتي لها الاثر الكبير في امراضية الفطر(Dhar واخرون، 1982و Mehrotra واخرون،1997 و Sett، 2000 و Ramezani، 2008 و Nalok، 2013).

أشارت النتائج (جدول7)ان جميع العزلات المختبرة من الفطر *M. phaseolina* حققت خفضاً معنوياً في معدل النسبة المئوية لانبات بذور زهرة الشمس،اذ حققت العزله11 M.p-اعلى نسبة خفض في النسبة المئوية للانبات 6.67، استناداً الى نتائج هذه التجربة تم انتخاب عزلة ممثله واحدة من الفطر لاستعمالها في التجارب اللاحقة هي Mp-11، هذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه Aboshosha واخرون(2007) و Ijaz واخرون(2012)و فياض واخرون(2009) و Mian و اخرون(2011) و Ronak(2014) من ان الفطر الممرض *M. phaseolina* المسبب الرئيس لمرض التعفن الفحمي على زهرة الشمس وقد سبب خفض في النسبة المئويةلانبات بذور نبات زهرة الشمس.

3-4-2. اختبار تأثير عزلات الفطر الممرض *Macrophomina phaseolina* في انبات بذور زهرة الشمس وبادراتها

جدول(7). الكشف عن عزلات الفطر *M. phaseolina* الممرضة في باستخدام بذور زهرة الشمس

المعاملات*	نسبة الانبات (%)	المعاملات*	نسبة الانبات (%)
Mp-12	33.33	Mp-13	20.00
Mp-15	33.33	Mp-11	6.67
Mp-2	33.33	المقارنة	100
LSD (0.05) =13.752			

*العدد بجانب الرمز يمثل رقم العزلة، Mp=*M. phaseolina*

3-5. عزل وتشخيص بكتريا *Azotobacter chroococcum*

تم الحصول على ثلاث عزلات من بكتريا *A. chroococcum* عزلت من تربة منطقة حول الجذور لنبات الحنطة واظهرت نتائج (الجدول 8) صفاتها المظهرية (صوره4) والمجهرية والكيموحيوية وهذا يتفق مع ماوجده مطلوب (2012) والكعبي (2013)و دايخ (2013)من ان البكتريا عصوية ومتحركة كما نها سالبه لصبغة كرام بالاضافة الى تمكنها من النمو في جميع الاختبارات الحيوية ومن ان الصبغة البنية كانت واضحة بمرور الوقت عند عزلهم للبكتريا *A. chroococcum* من الترب العراقية وهذه الصفات تتطابق مع الصفات.

الجدول8. الصفات المزرعية والمجهرية والكيموحيوية لتشخيص عزلات البكتريا ***A.chroococcum***

رقم* العزلة	الصفات المزرعية للمستعمرات			الصفات المجهريـــة للخـلايا				الصفات الكيموحياتية للعزلات			
	كثافة النمو	شكل النمو	لون المستعمرة	شكل الخلايا	تجمع الخلايا	الحركة	صبغة كرام	1% NaCl	0.1% فينول	2% كليسرول	37°م
Ac1	++	لزجة	بني فاتح	عصوي	مفردة	متحركة	سالبة	++	++	+++	++
Ac2	++	لزجة	بني فاتح	عصوية	ثنائي	متحركة	سالبة	+	+++	++	++
Ac3	+++	لزجة	بني فاتح	عصوية	ثنائي	متحركة	سالبة	++	+	++	+++

- لا يوجد نمو/+ نمو ضعيف/ ++ نمو متوسط/ +++ نمو كثيف،**Ac**=*Azotobacterchroococcum**العدد بجانب الرمز يمثل رقم العزلة

جدول9. بعض الصفات التفريقـية لتمـييز الانواع التابعة للبكتريا *Azotobacter* وكمية النتروجين المثبتة

نوع العزلة	رقم العزلة	استعمال المصادر الكاربونية المتعددة						وسط بيرك	كمية N_2 المثبتة ملغم.لتر$^{-1}$
		مانيتول	كلوكوز	فركتوز	سكروز	رامينوز	نشا		
A.chroococcum	Ac1	+++	+++	++	++	-	++	-	9.2
A.chroococcum	Ac2	+++	++	+++	++	-	++	-	11.5
A.chroococcum	Ac3	++	++	++	++	-	++	-	12.9

- لا يوجد نمو / + نمو ضعيف/ ++ نمو متوسط / +++ نمو كثيف ،

Ac=*Azotobacterchroococcum*، العدد بجانب الرمز يمثل رقم العزلة.

المجهرية للجـــنس*Azotobacter* (Holt وKrieg، 1984 و Holt واخرون، 1994 و Shankarappa و Madhav وRao، 1998 و AL-Azawy، 2010 و Prakash وKarthikeyan، 2013). اظهرت نتائج الجدول 9 بعض الصفات الكيموحيوية المستعملة للتفريق بين الأنواع التابعة للجنس *Azotobacter* حيث اظهرت النتائج قابلية عزلات البكتريا على استهلاك المصادر الكاربوهايدراتيه كمصادر للكاربون والمبينة في الجدول 9 فيما عدا سكر الرامينوز وعدم قدرتها على النمو في وسط بيرك وهذا يؤيد ماذكره قاسم وعلي (1989)و بشير(2003) و فرج (2012)، وعند مقارنة هذه الصفات مع صفات الانواع التابعة لجنس *Azotobacter* يمكن الاستنتاج بان جميع هذه العزلات هي تابعة للنوع *A. chroococcum*، كما اشار Ishac وYousef(1972) الى ان النوع *A.chroococcum* هو الاكثر سيادة في الترب العراقية، كما بين الجدول9 قيم تثبيت النتروجين للعزلات في وسط المانيتول الخال من النتروجين حيث اعطت العزلة Ac3 اعلى قيمة لتثبيت النتروجين اذ بلغت 12.9ملغم.لتر$^{-1}$.

3- 6عزل و تشخيص العزلات لبكتريا *brasilense Azospirillum*

بينت النتائج الحصول على ثلاث عزلات من بكتريا *A. brasilense*عزلت من منطقة حول الجذور لنبات الحنطة ومن خلال دراسة الصفات المزرعية والمجهرية والكيموحيوية للعزلات المدروسة والمبينة في الجدول10.والتي تتفق مع نتائج كل من بشير (2003) والمرعاوي واخرون(2013) و Francisco واخرون (2014) وبناء على ما ورد في معظم الدراسات التي بحثت هذا الموضوع فان هذه الصفات تتطابق مع الصفات المجهرية والمظهرية للجنس *Azospirillum* (Tarrand وآخرون، 1978 و Krieg و Khammas ، 1989و Dobereiner وآخرون، 1987) كما انها تميزت بقابليتها على تثبيت النتروجين في الوسط الزرعي شبه الصلب الخال من النتروجين Nfb مكونة نمواً غشائياً رقيقاً pellicle ابيض اللون تحت سطح الوسط الزرعي بمسافة 1-1.5سم

ويبدأ بالارتفاع نحو الاعلى ليصل بعد 48ساعة من الحضن في30°م الى2-3 ملم تحت السطح أي انها تثبت النتروجين تحت ظروف التهوية القليلة، اظهرت نتائج الجدول 11 بعض الصفات التفريقية المستعملة لتمييز الانواع التابعة للجنس *Azospirillum* اعتماداً على المفاتيح الخاصة للتفريق بين الانواع وحسب ما اشار اليه Tarrand وآخرون(1978) وDobereiner و Krieg (1984) و Holt واخرون(1994) فضلاً عن الفحوص التفريقية التي اقترحتها مهدي (1995) للتمييز بين الانواع الثلاثة (*A.lipoferum,* *A.brasilense, A.irakense*) مستبعدين وجود الانواع الاخرى في الترب العراقية (Khammas وآخرون1989). ولاسيما اختبار الحاجة للبايوتين وقابلية العزلات على استهلاك المصادر الكاربوهيدراتية كمصادر للكاربون والمبينة في الجدول 11،اثبتت النتائج بأن جميع العزلات تابعة للنوع *A.brasilense*حيث ان هذا النوع لا يستهلك البكتين على عكس بقية الانواع كما انه لا يستهلك بقية الانواع من المصادر الكاربوهيدراتية ولا تحتاج للبايوتين، كما يبين الجدول 11 قيم تثبيت النتروجين للعزلات في وسط Nfb الخال من النتروجين اذ اعطت العزلة Ab-3 اعلى قيمة لتثبيت

الجدول10. بعض الصفات المزرعية والمجهرية والكيموحيوية لتشخيص عزلات البكتريا *A.brasilense*

رقم العزلة	الصفات المظهرية للمستعمرات			الصفات المجهرية للخلايا			الصفات الكيموحيويـــة				
	الكثافة	الشكل	اللون	شكل الخلايا	الحركة	صبغة كرام	الاوكسديز	الكتاليز	NaCl %3	pH (6)	pH (7.5)
Ab1	++	لماعة	احمر	عصوي	متحركة	سالبة	+	+	+	++	++
Ab2	+++	لماعة	وردي	عصوي	متحركة	سالبة	+	+	++	+	++
Ab3	++	لماعة	وردي	عصوي	متحركة	سالبة	+	+	++	++	++

- لا يوجد نمو/+ نمو ضعيف/ ++ نمو متوسط/ +++ نمو كثيف ,**Ab**=*Azospirillumbrasilense*، العدد بجانب الرمز يمثل رقم العزلة

جدول11. الصفـات التفريقية لتميـيز الانواع التابعـة للبكتريا*Azospirillum* وكمية النتروجين المثبتة

نوع العزلـــة	رقم* العزلة	استعمال المصادر الكاربونية المتعددة						وسط الحاجة للبايوتين	كميةN2 المثبتة ملغم.لتر-1
		كلوكوز	مالتوز	لاكتوز	سكروز	مانيتول	بكتين		
A.brasilense	Ab1	-	-	-	-	-	-	-	10.8
A.brasilense	Ab2	-	-	-	-	-	-	-	11.5
A.brasilense	Ab3	-	-	-	-	-	-	-	11.6

- لا يوجد نمو/+ نمو ضعيف/ ++ نمو متوسط/ +++ نمو كثيف

*** العدد بجانب الرمز يمثل رقم العزلة، *Ab=Azospirillum brasilense***

النتروجين والتي بلغت 11.6 ملغم.لتر$^{-1}$. ان الاختلاف في قيم تثبيت النتروجين قد يعزى الى اختلاف التراكيب الوراثية للنوع الواحد ولا سيما فعالية انزيم النتروجينيز التي تختلف من عزلة الى اخرى وتتفق هذه النتائج مع ماوجده السالم(2003) و الكرطاني واخرون(2013).

7-3.القدرة التضادية للبكتريا *Azospirillum brasilense* و*Azotobacter chroococcum*ضد الفطرالممرض*M.phaseolina* (Mp-11) في الوسط PDA :

اوضحت النتائج (جدول 12)ان جميع عزلات البكتريا *A. brasilense*المختبرة احدثت خفضاً معنوياً في نمو عزلة الفطر الممرض Mp-11 المسببة لمرض التعفن الفحمي على زهرة الشمس، وبتفوق للعزلةAb-3 التي منعت نمو الفطريات الممرضة بالكامل وبنسبة تثبيط بلغت 100%،اما بقية العزلات للبكتريا *A. brasilense* فقد كانت فيها النسبة المؤية لتثبيط الفطر الممرض 84.33 و91.33% للعزلتين Ab-1 و Ab-2 على التوالي، ويعود هذا الاختلاف بالقدرة التبيطية للعزلات لعدة اسباب منها اختلاف قدراتها على تثبيط الفطريات المستهدفة عن طريق افرازها للمواد الايضية في الوسط ومنهاالمضادات الحيوية التي لهاالقدرة على تحليل هايفات الفطريات والانزيمات المحللة للجدران الخلوية(Glick و Bashan،1997 و Deoliveira و Concalves، 1998 و المرعاوي واخرون، 2013) وبينت النتائج في ان جميع عزلات البكتريا *A. chroococcum* عملت على خفض نمو الفطر Mp-11. وتميزت العزلة Ac-3 عن بقية العزلات وبتفوق معنوي في النسبة المئوية لتثبيط الفطر الممرض حيث بلغت 100%، اما بقية العزلات فقد احدثت تثبيط للفطر الممرض بنسب مئوية تراوحت بين 89.67-91.33%، ان التأثير الذي يسببه استعمال هذه

البكتيريا في تثبيط نمو الفطريات الممرضة للنبات قد يعود الى مقدرة البكتيريا على انتاج مواد ايضية ومركبات عضوية و اندول حامض الخليك وبعض الانزيمات والمضادات الحيوية ومن اهمها Azotobacterin و Conactine وانتاج سيانيد الهيدروجين وغيرها فضلاً عن منافستها للممرضات على المكان والمواد الغذائية (Pridachina واخرون، 1982 و Hillel، 2005 و Nia، 2015).

3-8. اختبار القدرة التضادية للفطر *Trichoderma harzianum*و مستحضر الاحياء المجهرية Effective microorganisms (EM-1)ضد الفطر *Macrophomina phaseolina* في الوسط الزرعي PDA

اظهرت النتائج في الجدول 13 ان فطر المقاومة الاحيائية *T. harzianum* حقق نسبة تثبيط عالية ضد الفطر الممرض *M.phaseolina*على الوسط الزرعي PDA اذ بلغت الدرجة 1 حسب السلم الذي وضعه Bell واخرون (1982) حيث غطى نمو الفطر*T. harzianum* كامل مساحة الطبق دون السماح للفطر الممرض بالنمو، يعود سبب قدرة الفطر*T. harzianum* التضادية الى افرازه بعض الانزيمات المحللة لجدران الخلايا مثل glucanases و chitinases (Elad، 2000) وانتاجها لمضادات الحيوية مثل gliotoxin التي تؤثر في الفطر الممرض سلباً (Mujeebur واخرون، 2004 و عبد، 2012)، واظهرت نتيجة الفحص المجهري أيضـاً أن الخيوط الفطريـة للفطر *T. harzianum* تلتف حول الخيوط الفطرية للمسبب المرضي وتنتج فروعاً قصيرة تلتف حوله وتؤدي إلى تفكك جدار خلاياه والتطفل عليه، و تعد هذه من الملاحظات التأكيدية والنادرة الخاصة بدراسة حالة التطفل الفطري Mycoparasitism بين هذين الفطرين صورة(3)،كما يتميز الفطر*T. harzianum* بسرعة نموه و بقدرته التنافسية العالية على العناصر المغذيه في وسطه وله القدرة على التـطفل حيث يلتـف على الخيوط الفـطرية لعائـله ويخـترق جدران الخلايا ويفـرغ محتواها من السايتوبلازم، ومن الدراسات التي أكدت على حدوث هذا النوع من التطفل ما ذكره Barakat وAl-Masri (2005) وBarakat واخرون (2006) و عبد (2012) و Hussain واخرون(2014). بينت النتائج في (جدول13)ان مستحضر الاحياء المجهرية EM-1 قد ثبط الفطر الممرض *M.phaseolina* بدرجة لا تقل اهمية عن الفطر الاحيائي *T. harzianum* حيث كانت النسبة المئوية لتثبيط الفطر الممرض 100% وهذا يتفق مع ما وجده الجراح (2012) والمرعاوي واخرون (2013) من ان التثبيط للفطر الممرض ناجماً بسبب المنتجات الثانوية كالمضادات الحيوية التي تنتجها البكتريا الموجوده في المستحضر EM-1 اثناء التخمر والتي تؤثر بشكل مباشر على الفطر الممرض *M. phaseolina* في الطبق وتؤدي الى تثبيطه، اشارت هذه الدراسات الى امكانية هذا المستحضر الحيوي في تقليل من اصابه بعض النبات بالفطريات الممرضه فقد اظهر فعاليه تضادية عاليه ضد الفطر*M.phaseolina* مما وفرحماية جيدة للنبات.

جدول12.المقدره التضاديةللبكتريا*Azospirillum brasilense* و*Azotobacter chroococcum* ضدالفطر الممرض*M.phaseolina* (Mp-11) في الوسط الزرعي PDA

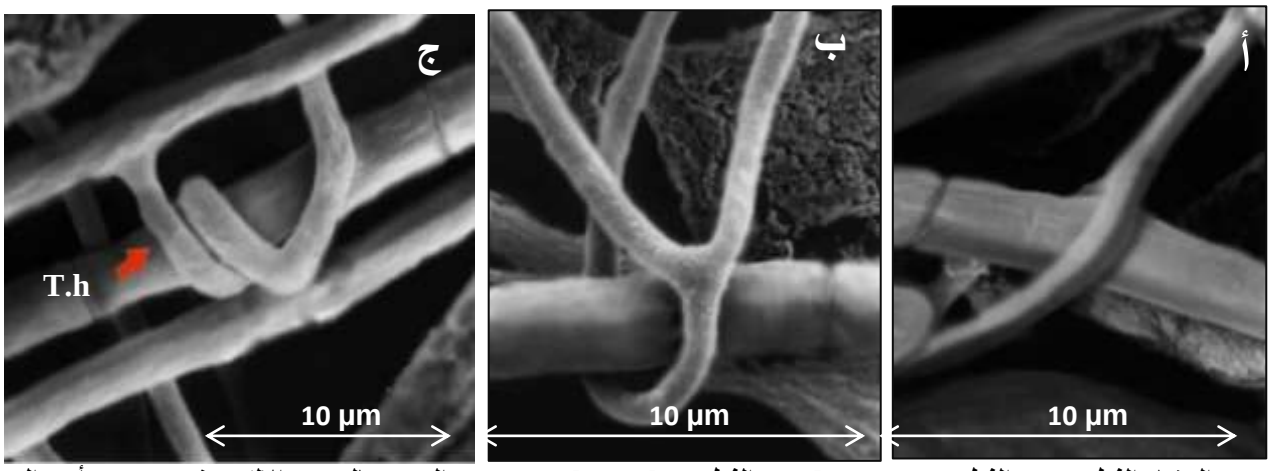
المعاملات*	% التثبيط	المعاملات*	% التثبيط
Mp-11+Ab-1	84.33	Mp-11+ Ac-1	89.67
Mp-11+ Ab-2	91.33	Mp-11 + Ac-2	91.33
Mp-11 + Ab-3	100	Mp-11+ Ac-3	100
Mp-11 بمفرده	0.00	قيمة LSD(0.05)	5.870

***MP**=*M.phaseolina* ،**Ac**=*Azotobacter chroococcum*،**Ab**=*Azospirillum brasilense*,
العدد بجانب الرمز يمثل رقم العزلة.كل رقم يمثل معدل ثلاث مكررات

جدول13. تاثير الفطر*T. harzianum* والمستحضر الحيوي EM-1 في نمو الفطر الممرض*M. phaseolina* على الوسط الزرعي PDA

المعاملـــــة*	قطـــــر مستعمرة الفطر (ملم)	% التثبيط
T.harzianum+Mp-11	0.00	100
Mp-11 + EM-1	0.00	100
Mp-11 بمفرده	9.00	0.00
قيمة LSD(0.05)	0.0061	8.156

*العدد بجانب الرمز يمثل رقم العزلة**MP**=*Macrophomina phaseolina*



صوره(3).التضاد الفطري بين الفطر*T. harzianum* والفطر*M. phaseolina* تحت المسح بالمجهر الالكتروني SEM. أ،ج-التصاق والتفاف الخيط الفطري للفطر *T. harzianum* حول الخيط الفطر*M. phaseolina*ب-التفاف وعمل ثقوب في الخيط الفطري للفطر *M. phaseolina*من قبل العامل الاحيائي*T. harzianum* .

9-3. تاثير البكتيريا *A. brasilense*و*A.chroococcum*والفطر *T. harzianum*و المستحضر الحيوي EM-1والمبيد الكيميائي Beltanol في خفض نسبة وشدة الاصابة بمرض التعفن الفحمي على زهرة الشمس تحت ظروف الظلة الخشبية

اظهرت النتائج (الجدول14) ان كل المعاملات التي استخدمت فيها عوامل المكافحة الاحيائية ادت الى خفض النسبة المئوية للاصابة وشدة الاصابه بمرض التعفن الفحمي على نبات زهرة الشمس، حيث حققت معاملة التداخل بين عامل المقاومة الاحيائية الفطر *T. harzianum* والبكتريا *A. chroococcum* معاملة التكامل بين المستحضر الحيوي EM-1 والفطر*T. harzianum* و *T. harzianum* مع *A. brasilense* بوجود الفطر الممرض خفضاً في نسبة وشدة الاصابة وهي بذلك حققت نتائج مقاربه لمعاملة المبيد الكيميائي، كما بين الجدول نفسه ان العوامل الاحيائية المضافة الى النبات مفردة او متداخله مع بعضها وفرت حماية تامة للنبات و عززت معاير النمو معنوياً قياساً بمعاملة الفطر الممرض، تلعب البكتريا *A. chroococcum* دوراً مهماً في التضاد مع الفطريات الممرضة من خلال منافستها على المكان والعناصر الغذائية ولاسيما عنصر الحديد لتكوينها Siderophore الذي قد يكون له أيضا دور محفز للمقاومة الجهازية المستحثة في النبات وما ينتج عنها من فعاليات ومركبات مثبطة للفطريات الممرضة (Glick و Bashan، 1997 و Van loon واخرون، 1998 و Hofte و Bakker، 2007 وكاظم، 2012 و خليف، 2015). 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 إضافة إلى استحثاث الميكانيكية الدفاعية للنباتات، كما يعمل على إنتاج الإنزيمات المحللة للجدار الخلوي للمسببات المرضية مثل B-1,3-glucanases، B-1,6-glucanases، Chitinases، Proteases كذلك ما ينتجه من المضادات الحيوية التي تؤهله على التطفل على الفطريات الممرضة فتعمل على قتلها و الحد من نموها فضلاً عن تحسين الحالة التغذوية للنبات وانتاج منظمات النمو وتحليل المواد العضوية وزيادة جاهزية العناصر الغذائية للنبات (Saba وآخرون، 2012 و Munir وآخرون، 2014 و Hasanوآخرون، 2014).وبين الجدول 14 ان جميع المعاملات المستخدمة لمكافحة مسبب مرض التعفن الفحمي حققت زيادة معنوية في مؤشرات النمو متمثلة في الوزن الطري والجاف قياساً بمعاملة الفطر الممرض بمفرده التي ادت الى خفض معنوي للوزن الطري والجاف، كما بين الجدول ان معاملة التكامل بين البكتريا *A. chroococcum*و الفطر الاحيائي *T.harzianum* بموجود الفطر الممرض، حققت وزن طري و جاف للنبات اعلى من المعاملات الاخرى بلغ 29.73 و 7.87 غم على التوالي وبذلك تفوقت على جميع المعاملات التي احتوت على الفطر الممرض مقارنة بمعاملة الفطر الممرض بمفرده، حيث حققت بقية المعاملات اوزان تراوحت بين 20.67-26.77 و 3.93-6.4غم على التوالي، ومن جانب أخر فان إضافة عوامل المكافحه الأحيائية بمفردها ادت الى زيادة معنوية في الوزن الطري والجاف لنبات زهرة الشمس وبتفوق معنوي لمعاملة التكامل بين*T.harzianum*و *A. chroococcum* بلغ 39.7 و 11.7 غم على التوالي، وهذا يتفق مع ماتوصل اليه عرنوص(2012) و Kasaواخرون(2015)من ان التكامل بين هذين العاملين الاحيائين اعطى اعلى زياده في النباتات المختبرة،كماحققت معاملة اضافة العوامل الاحيائية بمفردها *A. brasilense*زياده معنوية بلغت33.4 و 9.3 غم وزن جاف بفرق معنوي قياساً بمعاملة المقارنة التي بلغ عندها الوزن الطري 20.23 و 3.5 غم وزن جاف. بين الجدول 14 زيادة

معنويةلمعاملة*T. harzianum* و *A. chroococcum*بوجود الفطرالممرض في طول نبات زهرة الشمس قياساً بمعاملة المقارنة حيث بلغ طول المجموعالخضري والجذري54.6 و13.7 سم على التوالي وبذلك قد تفوقت على نتيجة اضافة المبيد الكيميائي والتي بلغ عندها النبات 50.33 سم طول خضري و 10.20 سم طول جذري، في حين اعطت جميع معاملات خلط العوامل الاحيائية نتائج جيدة في زيادة معايير النمو الخضري والجذري للنبات بطولخضريوجذري للنبات تراوح بين58.83– 65.33 و15.83-19.77 سم على التوالي وبفرق معنوي قياساً بمعاملة المقارنة.كما بينت النتائج في جدول 14 زيادة في حجم الجذور للنباتات التي تم اضافة العوامل الاحيائية بصورة متكامله او مفرده لتربه ملوثة بالفطر الممرض في زيادة معنوية في حجم قياساً بمعاملة الفطر الممرض التي بلغ عندها 0.33 سم^3،وهذا يتفق مع دراسات سابقة حيث ذكر الجبوري وآخرون (2007) و داؤد وآخرون (2008) في نتائجهم ان المستحضر الحيوي -EM 1 يعد من المخصبات الحيوية التي تعمل على إفراز عدد من منضمات النمو وتجهيز النبات بالفيتامينات الضرورية والتي تعمل على تحسين التوازن الهرموني وان الفطر الاحيائي *T.harzianum* اعطى في جميع معاملاته زياده نوعيه في معاير النمو للنباتات المختبرة لامتلاكه القدره على افراز محفزات لنمو النبات وانتاج منظمات نمو نباتية وبالتالي ينعكس على زيادة نمو حجم جذور ومعايير النمو بشكل عام، اما معاملة الفطر*T.harzianum* والبكتريا *A. brasilense* فقد اعطت النباتات التي اضيفت لها زيادة في حجم الجذور اعلى من بقية المعاملات التي خلت من الفطر الممرض وبفارق معنوي عالي قياساً مع معاملة المقارنة بلغ11.50سم^3، ومن جانب اخر فقد بينت نتائج جدول 14كفاءة معاملة*T.harzianum* و*A.chroococcum* بوجود الفطر الممرض زيادة محتوى الكلوروفيل للنبات بواقع 46.33 وبذلك حققت نتائج معنوية تفوق تاثير المبيد الكيميائي التي بلغ عندها الكلوروفيل 31.67 قياساً بمعاملة المقارنة ،

الجدول14. تاثير المعاملات الاحيائية ومستحضر EM-1 و المبيد الكيميائي على النسبة المئوية لنسبة وشدة الاصابه ومعدل الوزن الطري والجاف والطول الخضري والجذري وحجم الجذر ومحتوى الكلوروفيل لنبات زهرة الشمس تحت ظروف الظله الخشبية

المعاملات*	% الاصابة	%شدة الاصابة	الوزن الطري غم	الوزن الجاف غم	طول المجموع الخضري (سم)	طول المجموع الجذري (سم)	حجم الجذر (سم^3)	محتوى الكلوروفيل
بمفرده Mp-11	100	98.67	2.73	0.67	6.67	2.00	0.33	2.77
Ac-3+ Mp-11	46.60	29.33	22.06	3.93	48.50	9.50	4.93	40.67
Ab-3 +Mp-11	40.00	26.66	21.67	3.50	47.00	8.83	3.87	39.77
T. h+Mp-11	40.00	28.00	22.00	3.80	48.27	9.00	4.30	40.33
EM-1 +Mp-11	46.60	28.00	20.67	3.46	46.83	8.00	3.50	39.50
Beltanol +Mp-11	6.67	4.00	22.93	4.27	50.33	10.20	5.00	31.67
T.h+ Ac-3 +Mp-11	13.33	6.67	29.73	7.87	54.67	13.70	6.97	46.33
T.h+ Ab-3+ Mp-11	20.00	9.33	26.77	5.56	53.27	12.67	6.63	43.33
T.h+ EM-1 + Mp-11	13.33	6.67	25.57	6.57	54.43	13.17	7.40	44.67
Ac-3	0.00	0.00	32.57	8.46	58.83	15.83	8.47	48.33
Ab-3	0.00	0.00	33.46	9.30	60.47	16.67	8.80	50.67
T.h	0.00	0.00	32.97	8.67	59.93	15.93	8.70	51.00
EM-1	0.00	0.00	32.33	8.50	58.70	15..60	8.33	50.00
T.h+Ab-3	0.00	0.00	36.33	10.50	65.33	19.77	11.5	60.67
T.h+Ac-3	0.00	0.00	39.77	11.76	64.57	18.40	10.47	60.00
T.h+EM-1	0.00	0.00	37.25	10.20	64.50	18.60	10.9	60.00
المقارنة (نبات بمفرده)	0.00	0.00	20.23	3.50	40.67	7.93	3.10	31.67
قيمة LSD(0.05)	14.755	6.505	2.452	0.849	4.394	2.192	1.229	3.433

***Mp=*Macrophomina phaseolina*،Ac=*Azotobacterchroococcum*،Ab=*Azospirillumbrasilens*, T.h= *T.harzianum*, العدد بجانب الرمز يمثل رقم العزل**

اما بخصوص اضافة العوامل الاحيائية مفردة او مختلطة فقد تميزت برفع محتوى الكلوروفيل الى 60.67 وبفرق معنوي عالي قياساً معاملة تكامل الفطر*T. harzianum* مع البكتريا *A.brasilense* بمعاملة المقارنة وهذا يتفق مع ما ذكره Mehran

واخرون(2011) و عبد الامير (2012) Patra واخرون (2013) من ان اضافة البكتريا *A. chroococcum* و*A. brasilense* و الفطر*T. harzianum* الى التربه عمل على زيادة معايير النمو بشكل عام ومحتوى الكلوروفيل بشكل خاص في نبات زهرة الشمس. نستنتج من الدراسة الحالية انتشار مرض التعفن الفحمي لجذور وقواعد سيقان زهرة الشمس في كافةالمناطق التي شملها المسح في محافظة بابل، إن المسبب الرئيس لمرض التعفن الفحمي على زهرة الشمس هو الفطرالممرض *Macrophomina phaseolina* و امتلاك البكتريا*Azospirillum brasilense* و *Azotobacter chroococcum*والفطر *Trichoderma harzianum* و المستحضر الحيوي EM-1 مقدرة تضادية عالية ضد الفطر الممرض تحت الظروف المختبرية، إن استعمال فطر المقاومه الاحيائية *T. harzianum* بمفرده أو متكاملاً مع لقاح بكتيريا *A. chroococcum* ولقاح *A. brasilense* ومع المستحضر EM-1 وفر حماية لنباتات زهرة الشمس من الاصابة بالفطر وزاد معايير نمو النبات تحت ظروف الظله الخشبية. وهذه تعد اول اشارة في العراق لفعالية البكتريا *A. chroococcum* و *A. brasilense* والمستحضر EM-1 ضد الفطر الممرض *Macrophomina phaseolina* مرض التعفن الفحمي على زهرة الشمس.

المصـــــادر

الحديثي، هديل توفيق. (1983). الكتاب العملي في اساسيات علم البكتريا . مطبعة جامعة البصرة.112 ص.

الجبوري، جاسم محمد عزيز وخالد خليل احمد الجبوري ومحمد ابراهيم محمد مصطفى ومردان حميد مردان القطب. 2007. تطبيق تقانات التسميد الحيوي في بعض المحاصيل الحقلية وتاثيرها على القدرة الانتاجية. مجلة جامعة كركوك 2(2): 1-15 (عدد خاص بالمؤتمر الزراعي الاول للفترة من 4-5 ايلول).

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.2012.فاعلية مستحضر الاحياء المجهرية والمستخلصات النباتية ضد الفطرين المسببين لمرض سقوط بادرات الخيار. مجلة العلوم الزراعية العراقية. 43(2):55-66.

السالم، هتاف عبد الملك احمد(2003) تلقيح نبات الشعير ببكتريا *A.brasilence* واستجابتها لاضافة الحديد والمولوبيدنم.اطروحة دكتوراه.كلية الزراعة .جامعة بغداد.

الكرطاني،عبد الكريم عريبي سبع و عبد الله عبد الكريم الدوري وهبه محمد يوس.(2013). عزل وتشخيص بكتريا .Azospirillum .spp من بعض النباتات النامية في التربه الجبسية وتقيم كفائتها في تثبيت النتروجين و IAA. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعيه(13)2:310-320

الكعبي ،حوراء نعمة حسين .(2013) .فعالية عوامل احيائية وكيميائية ضد الفطر *Fusarium solani* المسبب لمرض تعفن جذور الشليك . رسالة ماجستير .الكلية التقنية المسيب .

الكيف، محمد احمد (2016). عزل وتشخيص مسببات تعفن جذور وقواعد سيقان الباقلاء في محافظة بابل ومقاومتها ببعض العوامل الحيوية والمستخلصات النباتية. رسالة ماجستير.الكلية التقنية/المسيب- جامة الفرات الاوسط.

الكيم، فنن عارف عبد الله.(2015). تقويم كفاءة بعض العوامل الأحيائية والمستحثات الكيميائية في مقاومة مرض خناق بادرات القطن المتسبب عن الفطر Kühn *Rhizoctonia solani* . رسالة ماجستير.الكلية التقنية/المسيب- جامة الفرات الاوسط.

المرعاوي، عدنان عبدالله و الجراح، نيران سالم و اسماعيل، عدي نجم.(2013). مكافحة مرض التعفن الفحمي على الباقلاء ببكتريا *Azospirillum brasilense* والبوكاشي.مجلة العلوم الزراعية العراقية(44)4: 472-479.

المنظمة العربية للتنمية الزراعية. 2013. الكتاب السنوي للاحصاءات الزراعية. المجلد 27، ص422.

بشير، عفراء يونس.(2003). التداخل بين المايكورايزا وبكتريا الازوتوباكتر والازوسبيرلم وتأثيره في نمو وحاصل الحنطة. اطروحة دكتورا، كلية الزراعة- جامعة بغداد.

جاسم، ناجي سالم و الكوراني، جوادين طالب. 2012. تاثير حامض Salycilc acid على الفطر *Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid* وتطور مرض العفن الفحمي على نبات زهرة الشمس *L.Helianthus annus*. مجلةالبصرةللعلومالزراعية، 25 (2): 58-71.

خليف، اريج احمد.(2015) المقاومة الحيوية للفطر *Fusarium oxysporum*المسبب لذبول الرقي باستخدام البكتريا *Azotobacter chroococcum* و*Bacillus thuringiensis* و*Bacillus cereus*. رسالة ماجستير.الكلية التقنية/المسيب- جامة الفرات الاوسط.

دايخ ، عتاب خير الله .2013 . تاثير بعض المستخلصات النباتية والمكافحة الاحيائية للفطريات

عبد الامير، عبد النبي .(2012) المكافحة الاحيائية لمسبب مرض التعفن الفحمي لنبات زهرة الشمس *Macrophomina phaseolina*بفطر المايكورايزا G.mosseae.وبعض انواع الفطر *Trichoderma* spp.اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة –جامعة البصره.

عبد، احمد فاضل.(2012). استخدام انواع من الجنس *Trichoderma* كمعاملة للبذور لمقاومة مرض سقوط البادرات *Rhizoctonia solani* Kuhn على نبات الطماطة. مجلة الفرات للعلوم الزراعية 4(4): 103-113.

فرج، حسين عرنوص. 2012. تأثير التداخل بين البكتريا *Azotobacter chroococcum* والفطر *Trichoderma harzianum* في النمو السكاني والتعايش الحيوي لهما بنبات الشعير. مجلة الفرات للعلوم الزراعية. 4 -(3) : 148-160.

فياض، محمد عامر و التميمي، هيفاء جاسم وبنيان، ليلى عبد الرحيم. 2009.المكافحة الاحيائية لمرض التعفن الفحمي على نبات زهرة الشمس المتسبب عن الفطر (Tassi) *Macrophomina phaseolina* Goid. مجلة البصرة للعلوم الزراعية. 22 (2):77-89.

قاسم ، غياث محمد و علي ،مضر عبد الستار (1989) . علم احياء التربة المجهرية. مطبعة التعليم العالي في الموصل . جامعة الموصل.

كاظم، علي عباس. (2012). استحثاث المقاومة في نبات البطاطا ضد الفطر *Rhizoctonia solani* باستخدام بكتريا *Azotobacter chroococcumr* والفطر *Trichoderma harzianum*. اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة – جامعة الانبار.

مطلوب، عهد عبد علي هادي . 2012 . تحديد مسببات تعفن جذور وقواعد سيقان الفاصوليا وتقويم فعالية بعض عوامل المكافحة الإحيائية في مقاومتها . أطروحة دكتورا. كلية الزراعة . جامعة بغداد

مهدي، ندى زكي (1995). عزل وتشخيص وكثافة بكتريا *Azospirillum* في المنطقة الجذرية لنبات الرز في محافظة ديالى . رسالة ماجستير. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

Aboshosha, S. S., Attalla S. I., EL-Korany A. E., and EL-Argawy E.. (2007). Characterization of *Macrophomina Phaseolina* Isolates Affecting Sunflower Growth in EL-Behera Governorate, Egypt. International J. of Agric. and Biol. 9 (6): 807-815.

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 .112pp.

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

Almeida, A. M.R., Amorim, L., Filho, A. B., Jorres., Farias, J. R., Pinto, M. C. and Valen, N.(2003). Progress of soybean charcoal rot under tillage and no tillage system in Brazil. Fitopathologia bra. vol. 28 (2) : 115-122.

Almomani, F., Alhawatema, M. and Khalid Hameed (2013).Detection, identification and morphological characteristic of *Macrophomina phaseolina*: the charcoal rot disease pathogens isolated from infected plants in Northern Jordan.Archives of Phytopathology and Plant Protection.46:(9)1005-1014

Andersson, H. ; D. Tago; and N. Treich.2014. pesticides and health: A review of evidence on health effects, valuation of ridkd, and benefit-cost analysis. Toulouse School of Economics (LERNA), 21 all. de Brienne, 31015 Toulouse Cedex 6, France.

Babu,B. K.; Anil K. S.; Alok K. S.; and Dilip K. A. (2007). Identification and detection of Macrophomina phaseolina by using species -specific oligonucleotide

Chamorro, M. , L. Miranda , P. Domínguez , J.J. Medina , C. Soria , F. Romero , J.M. L_opez Aranda , B. De los Santos .(2015).Evaluation of biosolarization for the control of charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina*) in strawberry .Crop Protection 67:279-289.

Concalves, A.F. and R.G. Deoliveira. 1998.Cyanide production by Brazilian strains of *Azospirillum* Rev. Microbiol. 29: 36-39.

Dhar, T. K., Siddiqui K. A. I. and Ali E.. (1982). Structure of Phaseolinone, a novel phytotoxin from *Macrophomina phaseolina*. Tel. lett. 23: 5459-5462.

Dobereiner,J. and Day,J. (1976). Associative symbiosis in tropical grasses.Characterization of microorganisms and dinitrogenfixing sites. In: Newton,W.E. and Nymans,C.J. (ed). Proceeding of the Ist international symposium on nitrogen fixation .2 : 518-538.

Elad, Y. (2000). Biological control of foliar Pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and Potential modes of action. Crop Prot. 19:709-714.

F.A.O. 2007.Production your book. 62:40-42.

Faruq, ChowdhuryGolam MdKhairuzzaman (2015) *Potentials of Azospirillum Spp. for improving shoot and root of a Malaysian sweet corn variety (J 58) under in vitro condition.* Int. J. Agric. Biol., 17 (2). pp. 395-398.

Francisco J. Choix , Yoav Bashan, Alberto Mendoza, Luz E. de-Bashan(2014). Enhanced activity of ADP glucose pyrophosphorylase and formation of starch induced by Azospirillum brasilense in Chlorella vulgaris. Journal of Biotechnology 177:22-34

Gill, H. ; H. Garg .2014. Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. chapter 8: 1-230 p.

Glick, B. R., and Bashan. 1997. Genetic manipulation of plant growth promoting primeR.s and probe.Mycologia, 99(6), 2007, pp. 797–803.

Baldani,V.L.D. and Dobereiner,J. (1980). Host-Plant Specificity in the infection of cereals with *Azospirillum spp.* . Soil Biol. Biochem. 12: 433-439.

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 Journal 2(2), 27-47.

Becking,J.H. (1981). The family Azotobacteraceae . In: Starr,M.P.(Ed): "The prokaryotes" Vol 1 . Springer-Verlag. Berlin. Heidelbery. New York. P. 795-817.

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 .

Black,C.A. (1965). Methods of soil analysis.Part 2.Chemical and Microbiological properties. Am. Soc. Agron., Inc. Madison, Wisconson,USA.

Bolkan, H. H., and E. E. Butler . 1974. Studies on heterokaryosis virulence of *Rhizoctoniasolani* . 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. Madison Wisconsin, USA.

Castro, C. M., S.D. Motta, F. A.kiba and R. L. D. Ribeiro. 1995. Potential use of EM for control of phytopathogenic fungi and bacteria.Proc. of 3rd International Conference on Kyusei Nature Farming. USA. 236-238.

southern Iraq. Technical Bulletin No.42 of the Inst. Appl. Res. On Natural Resources, Baghdad.

Johnson, R. ; M. Lynne .2015. Bee Health: The Role of Pesticides.Congressional Research Service: 43pp.

Kasa ,P. ,Hemalatha M.,Kishori B.(2015). Isolation, screening, and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolates of *Azotobacter* and *Trichoderma* and their beneficial activities. Journal of Natural Science, Biology and Medicine .Vol. 6 (2).360-363 pp.

Khammas,K.M., Ageron,E., Grimont,P.A. and Kaiser,P.(1989).*A.iraqins* sp.Nov.,A nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere Soil. Res. Micrbiol.140 : 679-693.

Krieg,N.R. and Dobereiner,J. (1984). Genus *Azospirillum* In: Krieg,N.R. and Holt,J.G. (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1 : 94-104. Williams and Wilkins, Baltimore-London.

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

Mehmet Emin Çalışkan and Sarbesh D. Dangol. 2016. genetic engineering studies on sunflower. 19th International Sunflower Conference, At Edirne, Turkey (19):651-658

Mehran, M., M. R. Ardakani, H. Madani, M. Zahedi, M. Amirabadi, and S. Mafakheri. 2011. Response of sunflower yield and phytohormonal changes to *Azotobacter, Azospirillum, Pseudomonas* and animal manure in a chemical free agroecosystem. Ann. Biol. Res. 2: 425-430.

Mehrotra, R. S. ; K. R. Aneja and A. Aggarwal. 1997. Fungal control agents . In environmental mentally safe approaches to crop disease control (Rechcigl , N.A. and Rechcigl , J.E. Ed.). pp. 111-137 CRC Press .

bacteria to enhance biocontrol of Phyto-pathogens. Biotech. Advan. 15(8):353-376.

Goldstein, J., Newbury, D.E., Joy, D.C., Lyman, C.E., Echlin, P., Lifshin, E., Sawyer, L., Michael, J.R.(2003). Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis, 3rd ed. New York .

Green, R. M. and Sambrook, J.(2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition. CSHL Press.

Harman, G. E. (2006). Overview of Mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96:190-194.

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.

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

Hofte, M. and P. A. H. M. Bakker. 2007. Competiton for Iron and Induced Systemic Resistance by Siderophores of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Soil Biol. 12:121-133.

Holt,J., Krieg,N.R., Sneath,P.H.A., Staley,J.T. and Williams,S.T. (1994). Bergey's manual determinative bacteriology. 9thEd .Williams and Wilkins, USA.

Howell, C. R. 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. Phytopathology 96: 178-180.

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.

Ishac,Y.Z. and Yousef,A.N.(1972). A study on density and species of Azotobacter in soil, water and leaf. Sample from

Microscopy and X-Ray Microanalysis .Springer Science+Business Media.

Pope, Kevin; Pohl, Mary E. D.; Jones, John G.; Lentz, 3 David L.; von Nagy, Christopher; Vega, Francisco J.; QuitmyerIrvy R.; "Origin and Environmental Setting of Ancient Agriculture in the Lowlands of Mesoamerica," Science, 18 May 2001:Vol. 292. no. 5520, pp. 1370 – 1373.

Prakash ,p; B .Karthikeyan . (2013) .Isolated and Purification of Plant Growth promoting Rhizobacteria (PGPR)from The Rhizosphere of *Acorus calamus* Grown Soil .India Streams Research Journal Vol. 3, (7).1-13 pp.

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.

Putnam, D. H. ; E. S. Oplinger ; D. R. Hicks ; B. R. Durgan ; D. M. Noetzel ; R. A. Meronuck ; J. D. Dol and E. E. Schalte. 2008. Sunflower Alternative Field Crops Manual. Last up dated: Thu mar. 27 , 10:5-10.

Ramezani, H. 2008. Biological control of root-rot of Eggplant caused by *Marcophomina phaseolina.* American-Eurasian J. Agric.and Environ. Sci. 4:218-220.

Rodriguez-Caceres,E.A. (1982). Improved.med.ium for isolation of *Azospirillum spp*. Appl. And Environ. Microbiol.44 : 990-991.

Ronak, A. Alireza Dalili, Siavash R. ayatpanah and Abasali Andarkhor.(2014). Evaluation of Sunflower Genotypes Against Charcoal RotsDisease *In vitro* and *In vivo* Condition. World Applied Sciences Journal 31 (4): 649-653.

Saba, H; Vibhash. D, Manisha. M, Prashant. K.S, Farhan. H and Tauseef. A. 2012.*Trichoderma* – a promising plant growth stimulator and biocontrol

Mian Hafeez Ullah, M. Aslam Khan, S. T. Sahi and A. Habib.(2010). Evaluation of antagonistic fungi against charcoal rot of sunflower caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. African Journal of Environmental Science and Technology . 5(8): 616-621.

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.

Nalok Dutta, Arka Mukhopadhyay, Anjan Kr. Dasgupta, and Krishanu Chakrabarti .2013. Nanotechnology Enabled Enhancement of Enzyme Activity and Ther mostability: Study on Impaired Pectate Lyase from Attenuated *Macrophomina phaseolina* in Presence of Hydroxyapatite Nanoparticle. PLoS Onev.8(5)1-10.

Ndiaye, M. (2007). Ecology and Management of Charcoal Rot (*Macrophomina phaseolina*) on Cowpea in the Sahel. Ph.D. thesis Wageningen Uni., Netherlands. 122pp.

Nia, E. 2015.Seed yield, some yield components and morphological traits of wheat as affected by Azotobacter and Pseudomonas bacteria inoculation. International Journal of Biosciences. 6(2): 1-5 p.

Patra P, Pati BK, Ghosh GK, Mura SS, Saha A (2013) Effect of Biofertilizers and Sulphur on Growth, Yield, and Oil Content of Hybrid Sunflower (*Helianthus annuus.* L) In a Typical Lateritic Soil. Scientific Reports. 2 (1):1-5 .

Patrick Echlin (2009). Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron

Thesis.Norwegian University of Science and Technology.56p.

Singh, A. ; M. shahid; M. Srivastava; S. Pandey; A. Sharma and V. Kumar. (2014). Optimal Physical Parameters for Growth of Trichoderma Species atVarying pH, Temperature and Agitation.Virology & Mycology. 3(1):2-7.

Tarrand,J.J., Krieg,N.R. and Dobereiner,J. (1978). A taxanomic study of the *Spirillum lipoferum* group with descriptions of a new genus , Azospirillum gen. nov.and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerink) comb. Nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov. Can.J.Microbio. 24: 967-980.

Tchan,Y.T. and Peter,N.B.(1984). Genus Azotobacter. In: Sneath,P.H., Mair,N.S. Sharpe,M.E. and Holt,J.G.(ed.s.):"Bergey"s manual of systematic Bacteriology" 1. William and Wilkins, :219-229.

Thompson,J.P. and Skerman,V.B.D. (1979). Azotobacteraceae.The Taxonomy and Ecology of Aerobic Nitrogen-Fixing Bacteria. Academic Press, London. 229pp.

Van Loon, L. C., P. A. H. M. Bakker and C. M. J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. 36: 453-483.

agent.Mycosphere 3(4), 524–531, Doi 10.5943/mycosphere/3/4/14.

Sallam, N. M. A., K. A. M. Abo- Elyousr and M. A. E. Hassan. (2008). Evaluation of *Trichoderma* species as biocontrol agents for damping-off and wilt disease of *Phoaseolus vulgaris* L. and efficacy of suggested formula. Egypt. J. Phtopathol. 36: 81-93.

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

Santos, G. Leyva-Mira, Guadalupe C. Velázquez-Martíneza, Bertha Tlapal-Bola˜nosa, Juan M. Tovar-Pedrazab, , Greta H. Rosas-Saitoc y and Omar G. Alvarado-Gómezd.(2015). Morphological and molecular characterization of isolates of *Macrophomina phaseolina* associated with sugarcane in Mexico. Rev Argent Microbiol.;47(2):143-147.

SAS. 2012. Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.

Su. G., Suh. S. O., Schnieder. R. W. and Russin. I. S. (2001).Host specialization in the charcoal rot fungus Macrophomina phaseolina. Phytopathology .91:120_126.

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

Shankarappa, T. H. and A. R.MadhavRao . (1998).Characterization and Identification of *Azotobacter* strains Isolated .from Mulberry rhizosphere soil In :Handbook of Biofertilizers and Biopesticiders .Deshmukh ,A.M, R.M.Khobragade , p.p.Dixit .Oxford Book Company .Jaipur ,India .140-146 pp.

Sharma, J. (2014). Regulation of alginate biosynthesis in *Azotobacter* spp. Master