مكافحة بيولوجية لمرض تعفن جذور اللوبياء *Vigna unguiculata* المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* باعتماد بعض الأنواع البكتيرية والفطرية

صفاء نعمت حسين

قسم هندسة البيئة، كلية الهندسة، الجامعة المستنصرية، العراق، البريد الإلكتروني: safaahussein1979@uomustansiriyah.edu.iq

الملخص

حسين، صفاء نعمت. 2019. مكافحة بيولوجية لمرض تعفن جذور اللوبياء *Vigna unguiculata* المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* باعتماد بعض الأنواع البكتيرية والفطرية. مجلة وقاية النبات العربية، 37(1): 31–39.

اللوبياء من النباتات الحساسة للفطر الممرض *Rhizoctonia solani* الذي يسبب خسائر اقتصادية كبيرة سنوياً في معظم دول العالم. تم الحصول على 45 عزلة من الفطر من مناطق زراعة المحصول في بعض مناطق وسط العراق. أظهرت نتائج اختبار الإمراضية على بذور اللوبياء مختبرياً تفوق العزلة Nrs-8 التي منعت إنبات البذور بالكامل قياساً إلى معاملة الشاهد التي بلغت نسبة الإنبات فيها 100%. أظهرت نتائج اختبار القابلية التضادية لعوامل المكافحة الأحيائية وهي البكتريا *Bacillus licheniformis* (Bl)، *Bacillus clausii* (Bc)، *Paenibacillus polymyxa* (Pp) و الفطران *Trichoderma viride* (Tv) و *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) ضد العزلة الممرضة Nrs-8 على الوسط الزرعي Potato dextrose agar (PDA)، تفوّق جميع العوامل الأحيائية المستخدمة في تثبيط نمو الفطر الممرض إذ بلغت نسبة تثبيط الأنواع البكتيرية والفطر Sc للفطر الممرض بين 68.61 و 90.28% وبلغت قابلية تضاد الفطر Tv 94.64%. أظهرت النتائج تباين تأثير عوامل المكافحة الأحيائية المستخدمة في مكافحة مرض تعفن جذور اللوبياء تحت ظروف البيت الزجاجي، وتفوقت معاملة اللقاح الخماسي Tv+Sc+Pp+Bc+Bl في تسجيل أعلى معدل نسبة إنبات بلغت 100.0% قياساً إلى معاملة الشاهد السالبة التي بلغت 67.5%، وخفض معدل نسبة حدوث المرض وشدته إلى 0.0% قياساً إلى معاملة الشاهد السالبة التي بلغت 77.5% و 51.3%، على التوالي. كما حققت معاملات اللقاح الثلاثي والرباعي والخماسي زيادة معنوية في معامل النمو متمثلةً بالوزن الجاف وقد تفوقت معاملة اللقاح الخماسي TV+Sc+Pp+Bc+Bl بتسجيل أعلى معدل للوزن الجاف بلغ 1.69 غ/نبات قياساً إلى معاملتي الشاهد السالبة والموجبة اللتان بلغتا 0.54 و 1.31 غ/نبات، على التوالي.

كلمات مفتاحية: تعفن جذور اللوبياء، مكافحة احيائية، *Rhizoctonia solani*.

المقدمة

يعد الفطر *Rhizctonia solani* أحد أهم فطور التربة التي تصيب طيفاً واسعاً من العوائل النباتية قد تصل إلى 500 نوع عائل نباتي (Farr *et al.*, 1995)، وقد أثبت Thies وآخرون (2005) أن نوع اللوبياء *Vigna unguiculata* الذي ينتمي إلى فصيلة Fabaceae يعد شديد القابلية للإصابة بهذا الفطر. ويسبب هذا الفطر عدداً من الأمراض الشائعة كموت البادرات قبل البزوغ وبعده وتعفن الجذور وقواعد السوق وتعفن البذور والثمار (Nirupama *et al*., 2017). وينتمي هذا الفطر اختياري التطفل وغير المتخصص في طوره اللاجنسي *R. solani* إلى الفطور العقيمة التي تنمو بالغزل الفطري دون أن تنتج أبواغاً بينما ينتمي طورها الجنسي *Thanatephorus cucumeris* إلى الفطور البازيدية من فصيلة Ceratobasidiaceae (Nasraoui، 2016) وهذا الطور الأخير هو نادر الوجود في الطبيعة ولا يدخل في الدورة الحياتية للفطر إلا استثنائياً. يتميز الفطر بتكوين خيوط فطرية سميكة ذات لون بني، تتفرع بزوايا قائمة تقريباً مع وجود تخنصر قرب منطقة التفرع وحاجز عرضي. ومن صفاته المميزة أيضاً تكوين أجسام حجرية (Sclerotia) متغايرة في الحجم (Blazier & Conway, 2004) تمكنه من المثابرة لعدة سنوات تحت الظروف البيئية غير المناسبة (Howard & Gent, 2007). يعيش الفطر في التربة على هيئة غزل فطري ضمن مدى حراري واسع 8–36 °س ورطوبة 20–75% (Lucas *et al*., 1985). يهاجم الفطر النبات في مراحل نموه المختلفة عندما تتوافر الظروف البيئية المناسبة لنموه، وتزداد فرصته بالإصابة مع توافر بعض العوامل المجهدة للنبات كالعطش والإصابة بالحشرات والنيماتودا والتعرض للأسمدة والمبيدات الكيميائية (جبر وآخرون، 2002). يخترق العائل مباشرةً من خلال الفتحات الطبيعية للنبات أو الجروح وذلك بعد تكوين وسائد إصابة (Infection cashion) وأعضاء التصاق (Appresoria) (Dillard، 1987). يضم الفطر سلالات عديدة تشخص عن طريق مجاميع

http://dx.doi.org/10.22268/AJPP-037.1.031039
© 2019 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

الاندماج السايتوبلازمي وتقنيات الوراثة الجزيئية (Carling *et al.*, 2002). ويقوم الفطر بإفراز الانزيمات والسموم الفتاكة لجدران خلايا العائل كأنزيمات Cellulase وPectinase وPhosphatase (Weinhold & Sinclair, 1996). وقد أشار Killani وآخرون (2011) أن الفطر *R. solani* من أخطر الفطور الممرضة لمحصول اللوبياء. كما وجد الموسوي (2012) ان هذا الفطر كان من أكثر الفطور تردداً في عينات نباتات اللوبياء المعزولة من محافظات وسط العراق، إذ ظهر في جميع العينات التي تم جمعها. وتهدف هذه الدراسة إلى عزل وتشخيص مسبب مرض تعفن جذور اللوبياء ومكافحته باستخدام بعض الأنواع البكتيرية والفطرية النافعة في العراق.

مواد البحث وطرائقه

المسح الحقلي لمرض موت بادرات اللوبياء

جرى التحري الحقلي عن مسبب مرض تعفن جذور اللوبياء في 5 حقول كانت مساحتها في حدود 1–2 هكتار في محافظات في وسط العراق وهي بابل والديوانية والنجف خلال شهري تموز/يوليو وآب/أغسطس 2017، حيث جمعت العينات الواقعة ضمن تقاطع الأقطار بواقع 10 عينات من كل حقل، وحسبت نسبة حدوث المرض حسب المعادلة التالية (Nirupama *et al.*, 2017):

$$\text{نسبة حدوث المرض (\%)} = \frac{\text{عدد النباتات المريضة}}{\text{العدد الكلي للنباتات المفحوصة}} \times 100$$

عزل وتشخيص مسبب مرض تعفن جذور اللوبياء

نقلت العينات إلى المختبر وغسلت بالماء الجاري لمدة 60 دقيقة. أخذت قطع بطول 50 مم من الجذور والسوق وطهرت سطحياً بمحلول هيبوكلورات الصوديوم بتركيز 1% لمدة دقيقتين ثم غطست في طبقين من الماء المقطر المعقم على التوالي لإزالة بقايا المادة المعقمة ونشفت بورق الترشيح المعقمة وتركت في موضع الفحص المعقم فترة لكي تجف. زرعت القطع في أطباق بتري تحتوي على الوسط الزرعي PDA (انتاج شركة Sigma Aldrich الأمريكية) المعقم عند حرارة 121 °س وضغط 1.5 كغ/ سم^2 ولمدة 15 دقيقة بواقع 4 قطع للطبق وحضنت عند حرارة 25±1 °س لمدة 7 أيام. نقيت العزلات الفطرية النامية على الوسط الزراعي وحسبت النسبة المئوية لظهور وتكرار الفطور في العزلات حسب المعادلات التالية (Hussein & Juber, 2014):

$$\text{نسبة ظهور الفطر (\%)} = \frac{\text{عدد مرات ظهور الجنس والنوع في العينات}}{\text{العدد الكلي للعينات}} \times 100$$

$$\text{نسبة تكرار الفطر (\%)} = \frac{\text{عدد القطع النباتية التي ظهر فيه الفطر في الاطباق}}{\text{العدد الكلي للقطع المستعملة في العينة}} \times 100$$

شخصت الفطور إلى مستوى الجنس والنوع اعتماداً على الصفات المزرعية والمظهرية وباتباع المفاتيح التصنيفية المعتمدة (Domsch *et al.*, 2007؛ Ellis, 1971؛ Klich, 2002؛ McClenny, 2005؛ Parmeter & Whitney, 1970).

اختبار القدرة الإمراضية لعزلات الفطر *R. solani*

تم اختبار القدرة الإمراضية لـ 45 عزلة من الفطر *R. solani* مختبرياً بحسب طريقة Pannecoucque *et al.* (2008) مع بعض التعديلات، وذلك بتحضير الوسط الزرعي Gamborg B5 medium (انتاج شركة Himedia الهندية) الغني بالعناصر الغذائية والأملاح. أضيف 23.2 غ من الوسط إلى لتر ماء مقطر مع التحريك المستمر لحين تجانس المحلول ثم أضيف له 20 غ من مادة Agar (انتاج شركة Oxoid البريطانية) عدلت درجة الحموضة (pH) للمحلول الى5.5 وعقم المحلول عند حرارة 121 °س وضغط 1.5 كغ/سم^2 لمدة 15 دقيقة وترك ليبرد إلى حرارة 45 °س ثم أضيف له 50 مغ/لتر من المضاد الحيوي Amoxicillin وصب في أطباق بتري (9 سم) وترك ليتصلب ثم تمت أضافة بذور اللوبياء (صنف بيادر) المطهرة سطحياً بمحلول هيبوركلوريت الصوديوم 1% والمجففة جيداً بواقع 10 بذور/طبق، ولقحت الأطباق في مركزها بقرص قطره 6 مم من عزلات الفطر *R. solani*، كلاً على انفراد وحضنت عند حرارة 25±1 °س لحين إنبات جميع بذور معاملة الشاهد. أما معاملة الشاهد فتضمنت البذور فقط من دون الفطر. كررت كل معاملة 4 مرات وحسبت نسبة الإنبات حسب المعادلة التالية (Al Juboory *et al.*, 2016):

$$\text{نسبة الإنبات (\%)} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{\text{العدد الكلي للبذور المستعملة}} \times 100$$

تحضير لقاح عوامل المكافحة الاحيائية

تم تحضير لقاح الأنواع البكتيرية *Bacillus licheniformis* (Bl)، *Bacillus clausii* (Bc) و *Paenibacillus polymyxa* (Pp) التي تم عزلها من المحيط الجذري لنباتات طماطم/بندورة سليمة في دراسة سابقة، وذلك بإضافة 1 مل من معلق بكتريات Bl، Bc و Pp كلاً على انفراد إلى 1 لتر من الوسط الزرعي السائل (Nutrient broth، انتاج شركة Carolina الأمريكية) بعد تعقيمها وتركها لتبرد ووضعت الدوارق في جهاز الرجاج الكهربائي على سرعة 200 دورة/دقيقة لمدة 48 ساعة

متواصلة ضمن ظروف المختبر ونقلت بعدها إلى الحاضنة عند حرارة 37±1 °س مع استمرار الرج اليومي لمدة 8 ساعات وجددت اللقاحات دورياً كل 10 أيام حسب الخطوات السابقة نفسها وتم قياس العدد

الكلي للعزلات البكتيرية بتقنية العد المباشر للمستعمرات البكتيرية (Pawsey, 1974)، وحسب تركيز الخلايا البكتيرية حسب المعادلة التالية (Harrigan, 1976):

$$\text{عدد البكتريا (1 مل من العينة)} = \frac{\text{عدد المستعمرات في الطبق}}{\text{تخفيف العينة}}$$

وتم تحضير فطر *S. cerevisiae* (Sc) الذي تم الحصول عليه من المنتج التجاري Saf. Instant (شركة Ozmaya San. A.S. التركية) بحسب طريقة Wan *et al.* (2003) مع بعض التعديلات، إذ تمت إضافة 5 غ من الفطر Sc في الوسط الزرعي NYDB المحضر من 8 غ Nutrient medium (انتاج شركة Carolina الأمريكية) + 5 غ مستخلص خميرة + 10 غ دكستروز + 1 لتر ماء مقطر ووضع في جهاز الرجاج الكهربائي على سرعة 200 دورة/دقيقة لمدة 24 ساعة وجمعت خلايا الفطر بوضع المعلق في جهاز الطرد المركزي على سرعة 6000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق. حضرت تخافيف لمركز الفطر في ماء مقطر معقم وتم قياس تركيزها باستعمال شريحة عد كريات الدم الحمراء Haemocetometer. تم تحضير لقاح الفطر *T. viride* (Tv) الذي تم الحصول عليه من دائرة البحوث الزراعية – العلوم والتكنولوجيا –وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، لتجارب البيت الزجاجي بإضافة 5 اقراص بقطر 6 مل من نموات الفطر على الوسط الزرعي PDA بعمر 4 أيام إلى دورق سعته 1000 مل يحتوي على 200 غ من بذور الدخن المحلي *Panicum miliaceum* و 100 مل ماء مقطر معقم عند حرارة 121 °س وضغط 1.5 كغ/سم^2 لمدة 20 دقيقة لمرتين متتاليتين تفصلهما 48 ساعة وحضن عند حرارة 25±1 °س لمدة 14 يوماً مع التحريك اليومي لتجانس وتوزيع اللقاح بشكل جيد.

تقويم كفاءة عوامل المكافحة الأحيائية ضد الفطر *R. solani* مختبرياً

اجري اختبار العزلات البكتيرية الثلاثة Bl و Bc وPp والفطر Sc وفق تقنية تسميم الطبق الزرعي وذلك بإضافة 10 مل من لقاح البكتريا والفطر كلاً على انفراد وبتركيز 10^6، 10^8، 10^5 و 10^3 (وحدة تكوين مستعمرة/مل)، على التوالي إلى أطباق بتري قطر 9 سم وصب فوقها وسط زرعي من الآجار المائي (2%) المعقم والمبرد إلى درجة حرارة 45 °س وتركت الأطباق لتتصلب في موضع العزل المعقم، ثم زرع مركز كل طبق بقرص قطر 6 مم سم من العزلة الفطرية الممرضة Nrs-8 المنماة على الوسط الزرعي PDA بعمر 4 أيام. كررت كل معاملة 4 مرات وتضمنت معاملة الشاهد أربعة أطباق أضيف اليها 10 مل ماء مقطر معقم والفطر الممرض وحضنت الأطباق عند حرارة 25±1 °س لحين وصول النمو الفطري إلى اطراف الطبق في معاملة الشاهد.

.تم اختبار قابلية التضاد للفطر Tv ضد عزلة الفطر الممرض Nrs-8 بتقنية الزرع المزدوج (Dual culture technique) وذلك بإضافة قرص بقطر 6 مم من النمو الفطري للعزلة Nrs-8 بعمر 4 أيام على مسافة 2 سم من حافة طبق بتري (9 سم) يحتوي على الوسط الزرعي PDA المعقم، وعلى المسافة نفسها من الجهة المقابلة تم إضافة قرص 6 مم من نموات الفطر Tv بعمر 4 أيام. أما معاملة الشاهد فتركت بدون إضافة الفطر Tv وكررت كل معاملة 4 مرات وحضنت عند حرارة 25±1°س وتم قياس قابلية التضاد بعد 7 أيام بقياس النمو الفطري للعزلة Nrs-8 باتجاه فطر المكافحة الأحيائية Tv مقارنة بالنمو الفطري للفطر نفسه في معاملة الشاهد. وحسبت نسبة التثبيط أو التضاد حسب المعادلة التالية (Skidmore & Dickison, 1976؛ Singh & Tripathi, 1999):

$$\text{نسبة التثبيط (\%)} = \frac{\text{قطر مستعمرة الشاهد - قطر مستعمرة المعاملة}}{\text{قطر مستعمرة الشاهد}} \times 100$$

مكافحة مرض تعفن جذور اللوبياء تحت ظروف البيت الزجاجي

تم اختبار كفاءة عوامل المكافحة الأحيائية المتضمنة للبكتريات Bl، Bc وPp والفطرين Sc وTv والخميرة Ss في مكافحة مرض تعفن جذور اللوبياء المتسبب عن الفطر *R. solani* تحت ظروف البيت الزجاجي وذلك بتعقيم تربة مزيجية بغاز بروميد المثيل (500 غ/م^3) تركت لمدة اسبوعين ثم عبئت في أصص بلاستيكية قطر 13 سم بواقع 1 كغ تربة/أصيص. تمت إضافة لقاح الفطر الممرض Nrs-8 إلى جميع المعاملات التي تطلبت ذلك بنسبة 1% (وزن/وزن). بعد 3 أيام من إضافة اللقاح تمت زراعة بذور لوبياء (صنف بيادر) المطهرة سطحياً بواقع 10 بذور/أصيص، وأضيف اثناء زراعة البذور لقاح العزلات البكتيرية Bl، Bc، Pp والفطر Sc بتركيز 10^6، 10^8، 10^5 و10^3 (وحدة تكوين مستعمرة/مل)، على التوالي، بواقع 100 مل/أصيص ولقاح الفطر Tv بنسبة 1% (وزن/وزن)، ووضعت في البيت الزجاجي وفق التصميم الكامل العشوائية عند حرارة 21–30 °س مع مراعاة السقي عند الحاجة. حضرت المعاملات التالية : معاملة الشاهد الموجبة بإضافة الدخن المعقم بمفرده بنسبة 1% (وزن/وزن)، معاملة الشاهد السالبة (الفطر Nrs-8) بمفرده، Bl+Nrs-8، Bc+Nrs-8، Pp+Nrs-8، Sc+Nrs-8، Nrs-Tv+8، Bc+Bl+Nrs-8، Pp+Bl+Nrs-8، Sc+Bl+Nrs-8، Nrs-Tv+Bl+8، Pp+Bc+Nrs-8، Sc+Bc+Nrs-8، Tv+Bc+Nrs-8، Sc+Pp+Nrs-8، Tv+Pp+Nrs-8، Tv+Sc+Nrs-8، Nrs-Pp+Bc+Bl+8، Sc+Bc+Bl+Nrs-8، Tv+Bc+Bl+Nrs-8، Nrs-

Nrs-8، Tv+Sc+Pp+Nrs-8، Tv+Pp+Bc+Nrs-8، Sc+Pp+Bc+8
Nrs-8، Tv+Pp+Bc+Bl+Nrs-8، Sc+Pp+Bc+Bl+8
Nrs-8، Tv+Sc+Pp+Bl+Nrs-8، Tv+Sc+Bc+Bl+8
Nrs-8. كررت كل معاملة 4 مرات، حسبت نسبة الإنبات بعد 15 يوماً من زراعة البذور وبعد 15 يوم آخر تم احتساب نسبة حدوث المرض، وتم احتساب نسبة شدة المرض بحسب معادلة McKinney (1923) بالإعتماد على الدليل المرضي المكون من 5 درجات والموصوف من قبل Dorrance *et al.* (2003)، حيث أن 0 = لا توجد اعراض تعفن جذور، 1 = ظهور تقرح أو تلون واضح على نسبة 1– 33% من الجذور، 2= تعفن الجذور بنسبة 34–50% تقريباً، 3= تعفن الجذور بنسبة 51–80% تقريباً، 4= أكثر من 81% أو موت النبات. وتم قياس الوزن الجاف للنباتات.

النتائج والمناقشة

المسح الحقلي لمرض موت بادرات اللوبياء

أظهرت نتائج المسح الحقلي لمرض تعفن جذور اللوبياء في بعض محافظات وسط العراق، وجود وانتشار المرض، إذ كانت نسبة حدوث المرض 20–40% (جدول 1)، وقد يعود سبب انتشار المرض لتكرار زراعة المحصول وعدم اتباع الدورات الزراعية والاستعمال العشوائي للمبيدات والأسمدة الكيميائية.

جدول 1. نسبة حدوث مرض تعفن جذور بادرات اللوبياء.
Table 1. Incidence of cowpea seedlings root rot.

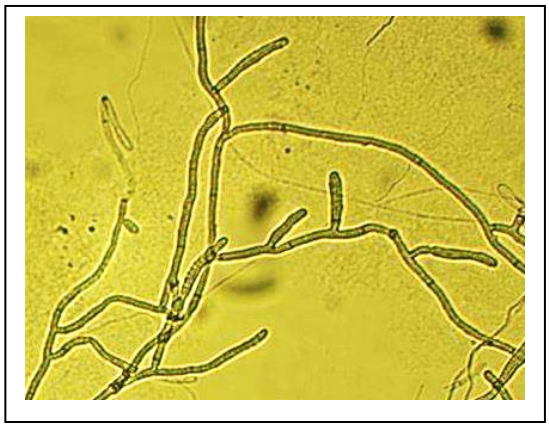
الموقع Location	نسبة حدوث المرض (%) Disease incidence (%)
النجف / المشخاب 1 Al-Najaf/ Al-Mishkhab 1	40
النجف/ المشخاب 2 Al-Najaf/Al-Mishkhab 2	30
الديوانية/ الشافعية Al-Diwaniyeh/Al-Shafeayeh	40
الديوانية/ الشنافية Al-Diwaniyeh/Al-Shinafiyeh	20
بابل / المسيب Babel/Al-Miseyyeb	40

عزل وتشخيص مسبب مرض موت بادرات اللوبياء

أظهرت نتائج العزل والتشخيص لعينات النباتات المريضة، ظهور فطور تعود إلى 7 أجناس و12 نوعاً (جدول 2) معظمها من فطور التربة. وكانت السيادة للفطر *R. solani* الذي بلغت النسبة المئوية لظهوره 64.71% وبتكرار 37.87% (شكل 1). إن نسبة الظهور تمثل عدد مرات ظهور الجنس والنوع في العينات قياساً إلى العدد الكلي للعينات ونسبة التكرار تمثل عدد القطع النباتية التي ظهر فيه الفطر في الزرع المختبري قياساً إلى العدد الكلي للقطع المستعملة في العينة. وقد يعود سبب وجود وانتشار هذه الأنواع الفطرية في حقول اللوبياء إلى انتقال الأبواغ أو الأجزاء الخضرية لهذه الفطور. مع مياه الري أو التربة العالقة مع المعدات الزراعية المتنقلة من حقل إلى آخر أو الرياح والحشرات. إن استراتيجيات المكافحة المختلفة المتبعة كالدورات الزراعية وتربية وتحسين النبات واستعمال المبيدات الكيميائية جميعها لا تعد كافية في مكافحة الفطر الممرض *R. solani* وذلك لقدرته على تكوين أجسام حجرية شديدة المقاومة للظروف الصعبة في التربة (Abbas *et al.*, 2017).

جدول 2. الفطور المرافقة لمرض تعفن جذور اللوبياء.
Table 2. Fungi associated with cowpea root rot disease.

الفطر Fungus	نسبة الظهور (%) Appearance (%)	نسبة التكرار (%) Frequency (%)
Alternaria spp.	29.41	12.13
Aspergillus niger	23.53	10.66
A. parasiticus	11.76	2.21
Aspergillus spp.	5.88	2.94
Fusarium culmorum	17.65	5.15
F. poae	23.53	1.47
F. solani	17.65	14.71
Fusarium spp.	23.53	16.18
Mucor racemosus	17.65	7.35
Pencillium spp.	35.29	16.91
Rhizoctonia solani	64.71	37.87
Rhizopus stolonifer	17.65	9.93



شكل 1. خيوط الفطر *R. solani* متفرعة بزوايا قائمة تقريباً مع وجود تخنصر قرب منطقة التفرع وحاجز عرضي.
Figure 1. Hypha of *R. solani* branched at almost right angle with a narrow restriction near the branch area with a transverse barrier.

اختبار القابلية الإمراضية لعزلات الفطر *R. solani*

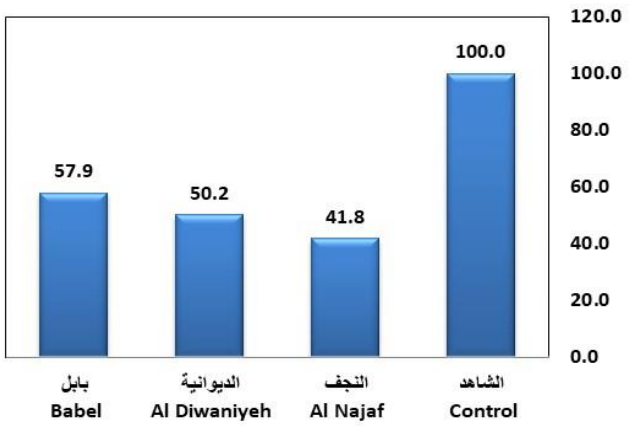
أظهرت نتائج الاختبار تبايناً في مستوى إمراضية عزلات الفطر *R. solani* البالغة 45 عزلة، إذ تراوح معدل نسبة إنبات البذور بين 12.5–90.0 % قياساً إلى معاملة الشاهد التي بلغت نسبة إنبات البذور فيها 100.0% (جدول 3)، وكانت العزلة Nrs-8 الأكثر ضراوة إذ بلغت نسبة الانبات في معاملتها 12.5%، تلتها العزلة Brs-10 التي بلغت عندها نسبة الإنبات 22.5 %، وعند مقارنة معدل نسب إنبات البذور في معاملات عزلات الفطر حسب التوزيع الجغرافي لتلك العزلات كانت عزلات محافظة النجف أكثر ضراوة إذ بلغ معدل نسبة الإنبات في معاملاتها 41.80% (شكل 2) تلتها عزلات محافظة الديوانية وبابل التي بلغ معدل نسبة الانبات في معاملاتها 50.16%، 57.91%، على التوالي، ولعل السبب يعود إلى الصفات الوراثية بين عزلات الفطر والتي تتأثر بالظروف البيئية السائدة ونوع التربة وتكرار زراعة المحصول.

جدول 3. تأثير عزلات الفطر *R. solani* في نسبة إنبات بذور اللوبياء.
Table 3. Effect of the *R. solani* isolates on cowpea seed germination.

العزلة الفطرية Fungal isolate	نسبة إنبات العائل (%) Host germination (%)	العزلة الفطرية Fungal isolate	نسبة إنبات العائل (%) Host germination (%)
الشاهد Control	100.0	Drs-5	32.5
Nrs-1	42.5	Drs-6	62.5
Nrs-2	40.0	Drs-7	67.5
Nrs-3	47.5	Drs-8	55.0
Nrs-4	27.5	Drs-9	42.5
Nrs-5	55.0	Drs-10	77.5
Nrs-6	30.0	Drs-11	35.0
Nrs-7	40.0	Drs-12	42.5
Nrs-8	12.5	Drs-13	32.5
Nrs-9	52.5	Drs-14	45.0
Nrs-10	50.0	Drs-15	27.5
Nrs-11	60.0	Brs-1	90.0
Nrs-12	35.0	Brs-2	45.0
Nrs-13	37.5	Brs-3	55.0
Nrs-14	30.0	Brs-4	27.5
Nrs-15	40.0	Brs-5	60.0
Nrs-16	55.0	Brs-6	85.0
Nrs-17	45.0	Brs-7	42.5
Drs-18	52.5	Brs-8	67.5
Drs-1	55.0	Brs-9	67.5
Drs-2	52.5	Brs-10	22.5
Drs-3	77.5	Brs-11	55.0
Drs-4	47.5	Brs-12	77.5
$LSD_{0.05}$		3.4	

تقويم كفاءة عوامل المكافحة الأحيائية ضد الفطر *R. solani* مختبرياً

أظهرت النتائج تفوق جميع عوامل المكافحة الأحيائية المستخدمة في خفض نمو عزلة الفطر الممرض Nrs-8 مختبرياً (جدول 4)، إذ تراوح معدل نسبة التثبيط في معاملات العزلات البكتيرية Bl، Bc و Pp والفطر Sc بين 68.61 و 90.28% قياساً إلى معاملة الشاهد (الفطر Nrs-8 بمفرده) الذي ملأ الطبق بعد 7 أيام من التحضين، كما تفوق الفطر Tv بتحقيق معدل نسبة تضاد بلغ 94.64%.



شكل 2. تأثير عزلات الفطر *R. solani* في نسبة إنبات بذور اللوبياء في المواقع المختلفة.
Figure 2. Effect of *R. solani* isolates on cowpea seed germination at different locations.

جدول 4. تأثير عوامل المكافحة الاحيائية ضد الفطر *R. solani* مختبرياً.
Table 4. Effect of different biocontrol agents against *R. solani in vitro.*

المعاملة Treatment	نسبة التثبيط (%) Inhibition rate (%)
الشاهد (Nrs-8 بمفرده) Control (Nrs-8 only)	0.00
Bl + Nrs-8	90.28
Bs + Nrs-8	80.28
Pp + Nrs-8	86.11
Sc + Nrs-8	68.61
Tv + Nrs-8	94.64
$LSD_{0.05}$	0.65

مكافحة مرض تعفن جذور اللوبياء تحت ظروف البيت الزجاجي

أظهرت النتائج تبايناً في تأثير المعاملات المختلفة في نسبة إنبات بذور اللوبياء إذ تراوح معدل نسبة الانبات بين 67.5 و 100.0% قياساً إلى معاملة الشاهد السالبة (الفطر بمفرده) التي بلغت 67.5% (جدول 5)، وحققت معاملة اللقاح الخماسي TV+Sc+Pp+Bc+Bl أعلى نسبة إنبات بلغت 100.0% (شكل 3)، كما تفوقت معاملة اللقاح الخماسي على بقية المعاملات في خفض نسبة حدوث المرض وشدته إلى 0.0% قياساً إلى معاملة الشاهد السالبة التي بلغت 77.5% و51.3%، على التوالي

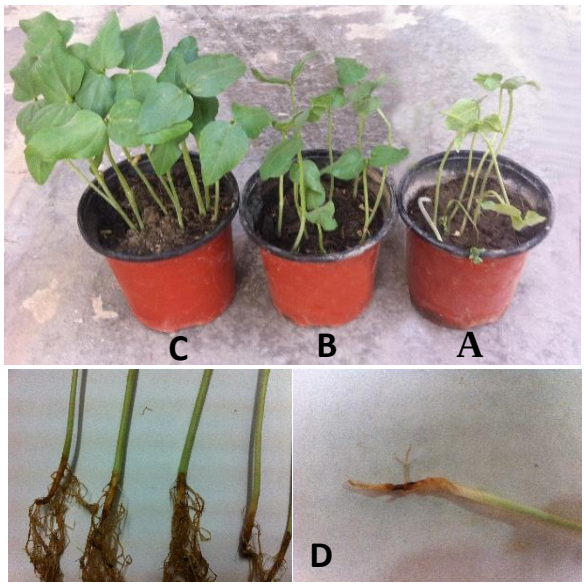
(جدول 5)، تلتها معاملة اللقاح الرباعي TV+Sc+Pp+Bc التي بلغت عندها نسبة حدوث المرض وشدته 27.5% و20.8%، على التوالي. تراوحت نسبة حدوث المرض في بقية المعاملات بين 32.5 و70.0% وشدة المرض بين 23.3 و45.3%، كما أظهرت النتائج زيادة معنوية في معامَلي النمو متمثلةً في الوزن الجاف عند معاملات اللقاح الثلاثي والرباعي والخماسي وقد تفوّقت معاملة اللقاح الخماسي TV+Sc+Pp+Bc+Bl بتسجيل أعلى معدل للوزن الجاف بلغ 1.69 غ/نبات قياساً إلى معاملتي الشاهد السالبة والموجبة اللتان بلغتا 0.54 و 1.31 غ/نبات على التوالي (جدول 5) تلتها معاملة اللقاح الرباعي Tv+Sc +Pp+Bc التي لم تختلف عنها معنوياً إذ حققت 1.41 غ/نبات. وتتفق هذه النتائج مع ما وجده Kamil *et al*. (2007) إذ اثبت كفاءة البكتريا *Bacillus licheniformis* في خفض نسبة الإصابة بالفطر *R. solani* من 60% إلى 25%، فضلاً عن قابليتها في إنتاج 5 انزيمات Chitinase التي تسهم بدورٍ كبيرٍ في قدرتها التثبيطية للمسببات المرضية (Ruiz-Sánchez *et al*., 2007)، كما أثبت Li *et al*. (2012) إمكانية بكتريا *Bacillus clausii* في انتاج انزيم Alkaline pectin lyase (APL) التي لها تأثير كبير في مكافحة العديد من المسببات المرضية.

جدول 5. تأثير عوامل المكافحة الأحيائية في نسبة إنبات بذور اللوبياء بوجود الفطر *R. solani*، وفي مكافحة مرض تعفن جذور اللوبياء تحت ظروف البيت الزجاجي.

Table 5. Effect of the biocontrol agents on cowpea seed germination in the presence of *R. solani* and on the control of cowpea root rot disease under greenhouse conditions.

الوزن الجاف (غ/نبات)	نسبة شدة المرض (%) Disease severity (%)	نسبة حدوث المرض (%) Disease incidence (%)	نسبة إنبات العائل (%) Host germination (%)	المعاملة Treatment
1.31	0.0	0.0	100.0	الشاهد الموجبة (إضافة دخن معقم فقط) Positive control (add sterilized millet only)
0.54	51.3	77.5	67.5	الشاهد السالبة (Nrs-8) بمفرده Negative control (Nrs-8 only)
0.55	44.8	65.0	70.0	Bl+Nrs-8
0.61	45.3	70.0	67.5	Bc+Nrs-8
0.57	41.5	65.0	72.5	Pp+Nrs-8
0.64	44.8	67.5	67.5	Sc+Nrs-8
0.57	41.5	60.0	75.0	Tv+Nrs-8
0.59	41.0	55.0	77.5	Bc+Bl+Nrs-8
0.56	40.5	50.0	75.0	Pp+Bl+Nrs-8
0.57	44.5	57.5	75.0	Sc+Bl+Nrs-8
0.69	38.5	52.5	77.5	Tv+Bl+Nrs-8
0.78	44.5	50.0	77.5	Pp+Bc+Nrs-8
0.77	41.5	62.5	75.0	Sc+Bc+Nrs-8
0.76	40.3	60.0	80.0	Tv+Bc+Nrs-8
0.79	41.5	60.0	75.0	Sc+Pp+Nrs-8
0.81	41.3	55.0	77.5	Tv+Pp+Nrs-8
0.80	43.0	57.5	77.5	Tv+Sc+Nrs-8
0.86	39.3	45.0	87.5	Pp+Bc+Bl+Nrs-8
0.89	39.5	42.5	85.0	Sc+Bc+Bl+Nrs-8
0.90	37.5	40.0	90.0	Tv+Bc+Bl+Nrs-8
0.97	41.5	45.0	87.5	Sc+Pp+Bc+Nrs-8
0.99	40.8	42.5	92.5	Tv+Pp+Bc+Nrs-8
1.06	34.5	40.0	90.0	Tv+Sc+Pp+Nrs-8
1.28	32.8	37.5	90.0	Sc+Pp+Bc+Bl+Nrs-8
1.38	23.3	30.0	95.0	Tv+Pp+Bc+Bl+Nrs-8
1.34	27.5	32.5	92.5	Tv+Sc+Bc+Bl+Nrs-8
1.39	24.3	32.5	95.0	Tv+Sc+Pp+Bl+Nrs-8
1.41	20.8	27.5	95.0	Tv+Sc+Pp+Bc+Nrs-8
1.69	0.0	0.0	100.0	Tv+Sc+Pp+Bc+Bl+Nrs-8
0.29	17.7	22.9	2.3	$LSD_{0.05}$

كما تعد بكتريا *Paenibacillus polymyxa* من البكتريا الجذرية المحفزة لنمو النبات Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) (Timmusk *et al*., 2005) وتتميز بالعديد من الخصائص المفيدة للنبات كإنتاج المضادات الحيوية والانزيمات المحللة وتثبيت النتروجين وتخصيب التربة وتحسين مواصفات فوسفات التربة وتركيب الهرمونات النباتية مثل الاوكسينات والسايتوكينين (Lebuhn *et al*., 1997؛ Timmusk *et al*., 1999)، ولها تطبيقات عديدة في مجال مكافحة المسببات المرضية للنبات كالفطر *Botrytis cinerea*، *Fusarium oxysporum* و *Phytophthora palmivora* فضلاً عن دوره في مكافحة المسببات المرضية البكتيرية كبكتريا *Erwinia carotovora* و *Pseudomonas syringae* (Honga *et al*., 2016؛ Khan *et al*., 2008؛ Lee *et al*., 2012؛ Timmusk *et al*., 2005). كما أثبت Shalaby و El-Nady (2008) كفاءة الفطر *S.cerevisiae* في مكافحة الفطر الممرض *Fusarium oxysporum* وزيادة نسبة إنبات بذور الشوندر/البنجر السكري، كما تمكن من تثبيط نمو الفطريْن *F. solani* و *R. solani* مختبرياً وفي الظروف الحقلية تمكن من خفض نسبة مرض تعفن جذور الفاصولياء بوجود الفطرين نفسيهما (Mokhtar & El-Mougy, 2014). وقد أثبت Schuster و Schmoll (2010) إمكانية الفطر *T. viride* في تركيب الفوسفات غير العضوي و IAA و Siderophore الذي بدوره يسهم بدور مهم في القابلية التضادية ضد الفطر الممرض *R. solani*، وتتفق هذه النتائج مع ما وجده Trivedi *et al*. (2017) الذين اثبتوا إمكانية الفطر *T. viride* في مكافحة مرض تعفن جذور الحمص المتسبب عن الفطر *R. solani*. وتعزى القدرة التضادية للفطر Tv إلى الآليات المتنوعة التي يؤثر من خلالها على الفطوريات الممرضة وتتميز طبيعة العلاقة التضادية بأنها من النوع الغذائي الحيوي (Biotrophic) إذ تنمو الخيوط الفطرية على مستعمرات الفطور الممرضة وتتطفل عليها مباشرةً وذلك بالتفاف غزلها الفطري حول خيوط الفطر الممرض أو يعود لقدرته على إفراز المضادات الحياتية وبعض الأنزيمات المحللة لجدران خلايا الفطر الممرض مثل Protease، β-1-Chitinase و 3-glucanase أو إنتاج سموم ومواد تقلل من نمو المسببات المرضية وتحد من تكاثرها فضلاً عن التنافس على الغذاء والمكان (Eziashi *et al*., 2007؛ Hussein, 2016؛ Sivan & Chet, 1989).



شكل 3. تأثير عوامل المكافحة الأحيائية المختلفة في مكافحة مرض تعفن جذور اللوبياء. (A) معاملة الشاهد السالبة (الفطر بمفرده)، (B) معاملة الشاهد الموجبة، (C) معاملة اللقاح الخماسي Nrs-8+Bl+Bc+Pp+Sc+Tv، (D) اعراض تعفن جذور اللوبياء في معاملة الشاهد السالب.

Figure 3. Effect of different biocontrol agents on the control of cowpea root rot disease. (A) Negative Control, (B) Positive control, (C) Five mix treatments Nrs-8+Bl+Bc+Pp+Sc+Tv, (D) Symptoms of root rot disease in the negative control.

Abstract

Hussein, S.N. 2019. Biological control of root rot disease of cowpea *Vigna unguiculata* caused by the fungus *Rhizoctonia solani* using some bacterial and fungal species. Arab Journal of Plant Protection, 37(1): 31-39.

Cowpea is a plant susceptible to infection with the pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*, which causes significant economic losses annually worldwide. 45 isolates of *R. solani* were isolated from different cropping areas in the middle and south of Iraq. Pathogenicity tests *in vitro* revealed that the isolate Nrs-8 was the most severe which prevented completely the germination of the seeds compared to the control (100%). The results of the *in vitro* antifungal activity test of the different bioagents *Bacillus licheniformis* (Bl), *Bacillus clausii* (Bc), *Paenibacillus polymyxa* (Pp), *Trichoderma viride* (Tv) and *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) against Nrs-8 on the potato dextrose agar indicated that all of them significantly inhibited the growth of *R. solani*; with inhibition rate of Bl, Bc, Pp, Sc ranged from 68.61 to 90.28%, whereas the inhibition rate of Tv was 94.64%. Under greenhouse conditions, the treatment of the mixture (Bl+Bc+Pp+Sc+Tv) was superior in controlling the root rot disease, and led to 100% seed germination, compared to the negative control which gave 67.5% seed germination. The mixture reduced the disease incidence and severity to 0.0% compared to 77.5% and 51.3% for the negative control, respectively. The treatments with three, four or five bioagents led to a significant increase in the plant growth parameters represented by the dry weight, whereas the mixture of five bioagents treatment was superior and exhibited 1.69 g/plant compared to 0.54 g/plant and 1.31 g/plant for the negative and positive controls, respectively.

Keywords: Biological control, *Rhizoctonia solani*, root rot, cowpea.

Corresponding author: ***Safaa Neamat Hussein, Environmental Engineering Department, College of Engineering, University of Al Mustansiriyah, Iraq, email: safaahussein1979@uomustansiriyah.edu.iq***

المراجع

الموسوي، محسن عبد علي محسن. 2012. تحديد مسببات مرض تعفن جذور وقواعد سيقان اللوبياء ومقاومته باستعمال بعض عوامل الاستحثاث الكيميائية والاحيائية. رسالة ماجستير، كلية الزراعة. جامعة بغداد، العراق. 99 صفحة.

جبر، كامل سلمان، نجاة عدنان سعد وعامر محمد بندر. 2002. تقويم كفاءة بعض فطريات المقاومة الأحيائية في مقاومة الفطر *Rhizoctonia solani* لوحده أو مع ديدان العقد الجذرية *Meloidogyne javanica* على الباذنجان. مجلة العلوم الزراعية العراقية، 33: 131–140.

Abbas, A., D. Jiang and Y. Fu. 2017. *Trichoderma* spp. as antagonist of *Rhizoctonia solani*. Journal of Plant Pathology and Microbiology, 8: 402. https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000402

Al Juboory, H.H., K.S. Juber and S.N. Hussein. 2016. Identification, pathogenicity and controlling of the *Macrophomina phaseolina* (tassi) goid the causal agent of the charcoal rot disease on watermelon. Journal of University of Duhok, 19: 558-564.

Blazier, S.R. and K.E. Conway. 2004. Characterization of *Rhizoctonia solani* isolates associated with patch diseases on turf grass. Proceeding of the Oklahoma Academy of Science, 84: 41-51.

Carling, D.E., R.E. Baird, R.D. Gitaitis, K.A. Brainard and S. Kuninaga. 2002. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 92: 893-899. https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.8.893

Dillard, H.R. 1987. Characterization of isolates of *Rhizoctonia solani* from lima bean grown in New York State. Phytopathology, 77: 748-751.

Domsch, K.H., W. Gams and T. Anderson. 2007. Compendium of Soil Fungi, 2nd edition. IHW-Verlag, Eching. 672 pp.

Dorrance, E., M.D. Kleinhenz, S.A. McClure and N.T. Tuttle. 2003. Temperature, moisture, and seed treatment effects on *Rhizoctonia solani* root rot of soybean. Plant Disease, 87: 533-538. https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.5.533

Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, U.K. 608 pp.

Eziashi, E.I., I.B. Omamor, E.A. Dimaro-Oruade and L.A. Ogunkanmi. 2007. Control of phytotoxin from *Ceratocystis paradoxa* using *Trichoderma* species phytotoxins on oil palm (*Elaeis quineensis* Jacq.) sprouted seeds. Plant Pathology Journal, 6: 324-329. https://doi.org/10.3923/ppj.2007.324.329

Farr, D.F., G.F. Bills, G.P. Chamuris and A.Y. Rossman. 1995. Fungi on Plants and Plant Products in the United States. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. 932-933.

Harrigan, W.F. 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, London, UK. 452 pp.

Honga, C.E., S.Y. Kwona and J.M. Parka. 2016. Biocontrol activity of *Paenibacillus polymyxa* AC-1 against *Pseudomonas syringae* and its interaction with

References

Arabidopsis thaliana. Microbiological Research, 185: 13–21.

Howard, F.S. and D.H. Gent. 2007. Damping -off and seedling blight. Pages 1-4. Available on internet: https://bugwoodcloud.org/bugwoodwiki/DampingOffSeedlingBlight-EggplantPepperTomato.pdf

Hussein, S. and K. Juber. 2014. First report of identification *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* race 1 and 2 the causal agent of crown and root rot disease of watermelon in Iraq. International Journal of Agriculture Innovations and Research, 3: 2319-1473.

Hussein, S.N. 2016. Molecular identification and integrated management of the *Fusaruim* f.sp. *cucumerinum* the causal agent of *Fusaruim* wilt disease of cucumber in Iraq. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, 4: 389-397. https://doi.org/10.18006/2016.4(4).389.397

Kamil, Z., M. Rizk, M. Saleh and S. Moustafa. 2007. Isolation and identification of rhizosphere soil chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol. Global Journal of Molecular Science, 2: 57–66.

Khan, Z., S.G. Kim, Y.H. Jeon, H.U. Khan, S.H. Son and Y.H. Kim. 2008. A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses root-knot nematode. Bioresource Technology, 99: 3016-3023. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.031

Killani, A.S., R.C. Abaido and A.K. Akintokun. 2011. Rice husk extract is potentially effective as a phytopesticide against root-/soil-borne fungal pathogens of cowpea. Nature and Science, 9: 72-79.

Klich, M. 2002. Identification of Common Aspergillus Species. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmel-culture.

Lebuhn, M., T. Heulin and A. Hartmann. 1997. Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa*strains isolated from different proximity to plant roots. FEMS Microbiology Ecology, 22: 325-334.

Lee, S.H., Y.E. Cho, S.H. Park, K. Balaraju, J.W. Par, S.W. Lee and K. Park. 2012. An antibiotic fusaricidin: a cyclic depsipeptide from *Paenibacillus polymyxa* E681 induces systemic resistance against Phytophthora blight of red-pepper**.** Phytoparasitica, 41: 49-58.

Li, Z., Z. Bai , B. Zhang , B. Li, B. Jin, M. Zhang , F. Lin and H. Zhang. 2012. Purification and characterization of alkaline pectin lyase from a newly isolated *Bacillus clausii* and its application in elicitation of plant disease resistance. Applied Biochemistry Biotechnology, 167: 2241-2256. https://doi.org/10.1007/s12010-012-9758-9

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.

Shalaby, M.E. and M.F. El-Nady. 2008. Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugar beet plants. Acta Biologica Szegediensis, 52: 271-275.

Singh, J. and N.N. Tripathi. 1999. Inhibition of storage fungi of blackgram (*Vigna mungo*) by some essential oils. Flavour and Fragrance Journal, 14: 1–4. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199901/02)14:1<1::AID-FFJ735>3.0.CO;2-R

Sivan, A. and I. Chet. 1989. The possible role competition between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia oxysporum* on Rhizosphere colonization. Phytopathology, 79: 198-203.

Skidmore, A.M. and C.H. Dickinson. 1976. Colony interactions and hyphal interference between *Septoria Nodorum* and phylloplane fungi. Transactions of the British Mycology Society, 66: 57–64

Thies, J.A., P.A. Berland and R.L. Fert. 2005. Response of cowpea cultivars to *Rhizoctonia solani* in field tests. HortSchince, 40: 876-879.

Timmusk, S., B. Nicander, U. Granhall and E.Tillberg. 1999. Cytokinin productionby *Paenibacillus polymyxa*. Soil Biology and Biochemistry, 31:1847-1852.

Timmusk, S., N. Grantcharova and E.G. Wagner. 2005. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. Applied Environmental Microbiology,71: 7292-7300.

Trivedi, A., S.K. Sharma, R. Chaudhary, D.K. Jajoria, R.K. Jain and S.K. Yadav. 2017. Management of dry root rot caused by *Rhizoctonia solani* in organic gram. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6: 3647-3652.

Wan,Y.K., S.P. Tian and G.Z. Qin. 2003. Enhancement of biocontrol activity of yeasts by adding sodium bicarbonate or ammonium molybdate to control postharvest disease of jujube fruits. Applied Microbiology, 37: 249–253. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01385.x

Weinhold, A.R. and J.B. Sinclair. 1996. *Rhizoctonia solani*: penetration, colonization and host response. Pages 163-175. In: *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. B. Senh, S. Jabaji-Hare, S. Neate and G. Dijst (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

McClenny, N. 2005. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture. Journal of Medical Mycology, 1: 125-128.

McKinney, H.H. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. Journal of Agriculture Research, 26: 195-218.

Mokhtar, M.M. and N.S. El-Mougy. 2014. Antagonistic yeast for controlling bean root rot disease under field conditions. International Journal of Engineering and Innovative Technology, 4: 212-220.

Nasraoui B. 2016. Les champignons et pseudo-champignons pathogènes des plantes cultivées: Biologie, Nouvelle systématique, Interaction pathologique [Pathogenic fungi and pseudo-fungi of cultivated plants: Biology, New systematic, Pathological interaction]. Editions Universitaires Européennes, Germany, 198 pp.

Nirupama, R.K., B.S Devi and S. Devi. 2017. Native *Trichoderma* for the Management of Wire Stem of mustard (*Brassica* spp.) Caused by *Rhizoctonia solani*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6: 2319-2328. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.609.284

Pannecoucque J., S. Van Beneden and M. Höfte. 2008. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* isolates associated with cauliflower in Belgium. Plant Pathology, 57: 737–746.

Parmeter, J.R. and H.S. Whitney. 1970. Taxonomy and nomencleature of the imperfect stage. Pages 7-19. In: *Rhizoctonia solani* Biology and Pathology. J.R. Parmeter (ed.). University of California, Berkely, Los Angeles.

Pawsey, R.K. 1974.Techniques with Bacteria. Hutchinson Educational Ltd., 3 Fitzroy Square, London w7.

Ruiz-Sánchez, R., R. Blake and H. Castro-Gámez. 2007. Short communication: changes in the association between milk yield and age at first calving in holstein cows with herd environment level for milk yield. Journal of Dairy Science, 90: 4830–4834. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0156

Schuster. A. and M. Schmoll. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology Biotechnology, 87: 787-799. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1

Received: March 26, 2018; Accepted: February 7, 2019

تاريخ الاستلام: 2018/3/26؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2019/2/7