المكافحة الحيوية لمرض التعفن الفحمي لمحصول الفلفل المتسبب بواسطة الفطر *Macrophomina phaseolina*

صفاء نعمت حسين[1] و ذكرى عطا إبراهيم[2]

(1) قسم هندسة البيئة، كلية الهندسة، الجامعة المستنصرية
(2) قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة ديالى

استلام 21 سبتمبر 2016م - قبول 2 نوفمبر 2016م

الملخص

يعد مرض التعفن الفحمي المتسبب بواسطة الفطر المرض *Macrophomina phaseolina* (Mp) من أهم الأمراض التي تفتك بطيف واسع من النباتات، وفي الآونة الأخيرة سجلت خسائر اقتصادية في العديد من مناطق زراعة محصول الفلفل بسبب هذا المرض.

هدفت هذه الدراسة إلى عزل وتشخيص مسبب مرض التعفن الفحمي لنباتات الفلفل في بعض محافظات الوسط والجنوب من العراق ومكافحته حيويًا.

أظهرت نتائج العزل والتشخيص مرافقة عدد من الفطريات وكانت السيادة للفطر *M. phaseolina*؛ إذ ظهر في جميع العينات بمعدل نسبة تكرار 53.23 %. تباينت عزلات الفطر Mp في مقدرتها الإمراضية على بذور الفلفل مختبريًا، وقد خفضت العزلة Mbs-3 نسبة الإنبات إلى 12 % قياسًا إلى معاملة المقارنة التي بلغت 100 %. حققت جميع عوامل المكافحة الحيوية المستخدمة وهي البكتيريا الجذرية *Pseudomonas putida* (Pp) و *Azospirillum brasilense* (Ab) و *Azotobacter chroococcur* (Ac) *Serratia odorifera* (So) و *Enterobacter cloacae* (Ec) خفضًا معنويًا في معدل نمو عزلة الفطر المرض Mbs-3 على الوسط الزراعي Potato dextrose agar (PDA)، وأعطت معاملة اللقاح الخماسي Ac+Ab+Pp+Ec+So أعلى معدل نسبة تثبيط بلغت 100 % قياسًا إلى معاملة المقارنة التي ملأت الطبق بعد (7) أيام.

وتحت ظروف البيت الزجاجي حققت جميع عوامل المكافحة الحيوية زيادة معنوية في نسبة إنبات البذور تراوحت بين 87.5–100.0 % قياسًا إلى معاملة المقارنة السالبة (الفطر بمفرده) التي بلغت 60.0 %. وقد تفوقت معاملة اللقاح الخماسي في خفض معدل النسبة المئوية للمرض وشدته؛ إذ بلغت في معاملاتها 0 % قياسًا إلى معاملة المقارنة السالبة التي بلغت فيها نسبة المرض وشدته 97.5 % و 74.7 % على التتابع. كما حققت جميع عوامل المكافحة الحيوية زيادة معنوية في مؤشرات النمو متمثلةً بالوزن الجاف للنباتات.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا المحفزة لنمو النبات، العدوى الحقلية، العدوى المعملية.

المقدمة

الفلفل *Capsicum annuum* من العائلة الباذنجانية *Solanaceae* أحد أهم محاصيل الخضر الرئيسية المتداولة عالميًا (Hassan, 2001). يشهد إنتاج الفلفل عالميًا تزايدًا مستمرًا لما يحتويه من قيمة غذائية عالية من الفيتامينات والبروتينات والكربوهيدرات والأملاح (Kelley and Boyhan, 2006).

بلغت المساحة المزروعة بالفلفل في العراق (14101) دونم (الدونم=2500م^2) عام 2015م، وبمعدل إنتاج (28568) طن/ دونم (CSO, 2016).

يتعرض الفلفل للإصابة بالعديد من الأمراض التي ينجم عنها خسائر اقتصادية كبيرة، ويعد مرض التعفن الفحمي المتسبب عن الفطر *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid أحد أهم الأمراض التي تفتك بالمحصول.

ويعد الفطر Mp اختياري الترمم غير متخصص، ومن أهم المسببات المرضية المستوطنة في التربة والمنتقلة بالبذور، يسبب مرض التعفن الفحمي، التعفن الجاف للجذور، الذبول، لفحة الساق والأوراق وسقوط البادرات (Arora *et al*., 2001)، يصيب مدى واسعًا من العوائل النباتية قد تصل إلى (500) عائل نباتي ومن بينها الفلفل (Purkayastha *et al*., 2006: Khan, 2007).

لا توجد إحصائيات تشير إلى حجم الخسائر الناجمة في محصول الفلفل عن هذا المرض في العراق، ولكن تشير الدراسات العالمية إلى خطورة المرض على العديد من المحاصيل الاقتصادية (Muchero

et al., 2011).

إن المدى العائلي الواسع للفطر يجعل بعض طرق الوقاية الشائعة غير مجدية في المكافحة؛ مثل اتباع الدورات الزراعية أو استخدام الأصناف المقاومة أو المتحملة للمرض (Csondes *et al*., 2007).

يصيب الفطر العائل النباتي في أية مرحلة من مراحل النمو، وتظهر الأعراض المثالية للمرض بظهور بقع مائية على الجذور الرئيسية وقواعد السيقان، وتتحول إلى اللون البني المسود بالتدريج، وتتسع البقع بتقدم الإصابة، وتمتد إلى الجذور الثانوية والساق، وبتطور الإصابة تظهر أعراض ذبول وجفاف الأوراق والأفرع الثانوية وموت النبات بالنهاية (Kendig and Rupe, 1990: Sun *et al*., 2015).

ويعد الإجهاد البيئي -كارتفاع درجات الحرارة والجفاف- من العوامل المساعدة في ظهور أعراض وعلامات المرض ولا سيما في مرحلة التزهير وعقد الثمار (Kendig *et al*., 2000).

للفطر القابلية على البقاء في التربة لمدة تزيد عن (10) أشهر تحت ظروف الجفاف الشديد على هيئة أجسام حجرية، والتي تعد بدورها الوسيلة الرئيسية لبقاء الفطر (Khan, 2007).

تستعمل المبيدات الكيميائية عادةً في مكافحة المرض، ونتيجةً لآثارها السلبية على البيئة توجهت الاهتمامات إلى البدائل الصديقة للبيئة كالمكافحة الحيوية (Rosskopf *et al*., 2005).

تعد المكافحة الحيوية باستخدام الأحياء المجهرية النافعة المتواجدة في الطبيعية -كالتربة والمياه والنبات- أحد أهم الإستراتيجيات لإدارة أمراض النبات ضمن إطار حماية البيئة، وتستخدم عادةً أنواعا من البكتيريا النافعة؛ كالبكتيريا الجذرية المحفزة لنمو النبات Plant (PGPR) growth promoting rhizobacteria وأنواعًا من الفطريات النافعة مثل *Trichoderma harzianum* و *Chaetomium cupreum*، والتي تنتج أحيانًا على هيئة مستحضرات حيوية مثل المبيد الحيوي Cedmon, Mycostop, Remedier و BioMortal. (Eilenber *at al*., 2001: Roberti *et al*., 2012)

وتختلف الآليات التي تعمل بها عوامل المكافحة الحيوية؛ فقد تكون بإنتاج المضادات الحيوية، استعمار الجذور، المنافسة على الغذاء والمكان، استحثاث المقاومة الجهازية (ISR)، تعزيز نمو النبات أو التطفل المباشر على المسببات المرضية (Choudhary and Johari, 2008: Kim *et al*., 2012).

هدفت الدراسة إلى عزل وتشخيص مسبب مرض التعفن الفحمي لنباتات الفلفل في بعض المحافظات العراقية ومحاولة مكافحته حيويًا باستعمال عزلات من البكتيريا الجذرية النافعة وهي *Azotobacter chroococcur* و *Azospirillum brasilense* و *Pseudomonas putida* و *Enterobacter cloacae* و *Serratia odorifera*.

المواد وطرق العمل

عزل وتشخيص مسبب مرض التعفن الفحمي

جمعت عينات من نباتات فلفل تبدو عليها أعراض مرض التعفن الفحمي من حقول مختلفة في ثلاث محافظات في وسط وجنوب العراق؛ وهي بغداد وبابل وكربلاء للفترة 2014-2015 (شكل 1).

حفظت العينات في أكياس بولي إثيلين نظيفة، ونقلت إلى المختبر لإجراء عملية العزل، غسلت أجزاء من جذور وسيقان العينات تحت ماء الصنبور لمدة (15) دقيقة، وقطعت إلى أجزاء صغيرة (0.5 سم) تقريبًا، وعقمت سطحيًا في محلول هيبوكلورات الصوديوم 1 % لمدة (2) دقيقة، ثم غطست بالتتابع في ثلاثة أطباق تحتوي على ماء مقطر معقم، نشفت باستعمال ورق نشاف معقم، وتركت لتجف في كابينة العزل.

زرعت القطع في أطباق بتري (9 سم) تحتوي على الوسط الزرعي PDA المضاف له (200 ملغ/ لتر) من المضاد الحيوي Amoxicillin، بواقع أربع قطع لكل طبق، وحضنت في درجة حرارة (25±2م°) لمدة (5-7) أيام.

تم تنقية النموات الفطرية على الوسط الزرعي نفسه، وشخصت العزلات الفطرية اعتمادًا على المفاتيح التصنيفية (Ellis, 1971: Booth,1977: Sutton, 1980: Domsch *et al*., 2007). وحسبت النسبة المئوية لظهور المرض وتكراره حسب طريقة Hussein and Juber (2014).

شكل (1): عينات من نباتات فلفل تظهر عليها أعراض مرض التعفن الفحمي

اختبار إمراضية عزلات الفطر *M. phaseolina* على بذور الفلفل

اختبرت المقدرة الإمراضية لثلاث وعشرين عزلة من الفطر Mp مختبريًّا على بذور الفلفل، صنف Anaheim California إنتاج شركة Sustainable seed الأميركية غير معفرة بالمبيدات الفطرية على الوسط الزرعي Water agar المضاف له 200 ملغ/ لتر من المضاد الحيوي Amoxicillin، لقح مركز الأطباق بقرص (0.5 سم) من النمو الفطري لكل عزلة على انفراد المنماة على الوسط الزرعي PDA عمر (7) أيام. زرعت كل عزلة بانفراد وحضنت لمدة (3) أيام، ثم أضيف لكل طبق (25) بذرة من بذور الفلفل المعقمة سطحيًّا وبأربعة مكررات لكل معاملة، وحضنت الأطباق لمدة (10) أيام. حسبت النسبة المئوية لإنبات البذور وفق المعادلة التالية (Bolkan and Butler, 1974):

(%) للإنبات = عدد البذور النابتة/ عدد البذور الكلي X 100

اختبار المقدرة التضادية لعوامل المكافحة الحيوية ضد الفطر الممرض مختبريًّا

اختبرت المقدرة التضادية لعزلات البكتيريا الجذرية *A. chroococcur* (Ac) و*A. brasilense* (Ab) و *E.cloacae* (Ec) و*P. putid* (Pp) و*S. odorifer* (So) التي تم الحصول عليها من دراسات سابقة، عدا عزلة بكتيريا Ac التي تم الحصول عليها من وزارة العلوم والتكنولوجيا/ دائرة البحوث الزراعية ضد عزلة الفطر الممرض Mbs-3، وبطريقة تسميم الوسط الزرعي، نميت العزلات البكتيرية على الوسط الزرعي Nutrient broth المعقم، وحضنت في درجة حرارة (28±2م°) لمدة (5) أيام مع التحريك المستمر، وحسبت تراكيز كل عزلة بطريقة عد الأطباق (Harrigan, 1976).

أضيف (1 مل) من اللقاح البكتيري لكل عزلة على انفراد إلى أطباق بتري معقمة (9 سم)، وصب عليها (15–20 مل) من الوسط الزرعي PDA المعقم وترك ليتصلب، أضيف إلى مركز كل طبق قرص قطر (0.5 سم) من عزلة الفطر الممرض Mbs-3. كررت كل معاملة (4) مرات، وتركت (4) أطباق دون إضافة اللقاح البكتيري كمقارنة، وحضنت الأطباق في درجة حرارة (25±1م°) لحين وصول نمو الفطر في معاملة المقارنة إلى حافة الأطباق، وحسبت النسبة المئوية للتثبيط بحسب المعادلة الآتية (Janssen *et al*., 1986: Barrata and Dorman, 1998):

% للتثبيط = (متوسط قطر مستعمرة المقارنة – متوسط قطر مستعمرة المعاملة) / متوسط قطر مستعمرة المقارنة X 100

تقييم كفاءة عوامل المكافحة الأحيائية في مكافحة المرض تحت ظروف البيت الزجاجي

حضر لقاح عزلة الفطر الممرض Mbs-3 حسب طريقة Dewan (1989) بإضافة (4) أقراص قطر (0.5 سم) من النمو الفطري على الوسط الزرعي PDA عمر (7) أيام إلى دوارق سعة (250 مل) تحتوي كل منها على (50 غم) من بذور الدخن المحلي *Panicum miliaceum* المعقم لمرتين متتاليتين في جهاز المؤصدة في درجة حرارة (121م°) ضغط (1.5 كغم/ سم^2) لمدة (15) دقيقة، وحضنت في درجة حرارة (25±1م°) لمدة (14) يومًا مع التحريك المستمر.

أضيف لقاح الفطر الممرض إلى تربة مزيجية معقمة في أصص سعة (1 كغم) بنسبة 1 % (وزن/ وزن)، زرعت (10) بذور من الفلفل معقمة سطحيًّا بمحلول هيبوكلورات الصوديوم 1 % في كل أصيص، وهيئت المعاملات التالية Ac+ Mbs-3, Ab+ Mbs-3, Ec+ Mbs-3, Pp+ Mbs-3, So+ Mbs-3, (Ac, Ab, Ec, Pp, So) + Mbs-3 ومعاملة المقارنة الموجبة (Control) التي أضيف لها الدخن المعقم دون الفطر الممرض.

أضيف (50 مل) من اللقاح البكتيري كلٌّ على انفراد تركيز (10^8) وحدة تكوين مستعمرة/ مل إلى المعاملات الخاصة بها مع موعد زراعة البذور مباشرة. وزعت الأصص حسب التصميم تام العشوائية في البيت الزجاجي وبأربعة مكررات لكل معاملة. سقيت الأصص بعناية، وتم حساب نسبة الإنبات بعد (15) يومًا والنسبة المئوية للمرض وشدته بعد (75) يومًا من الزراعة وفق المعادلة التالية (Hussein, 2014):

% للمرض = (عدد النباتات المريضة / العدد الكلي للنباتات المفحوصة) X 100

وقدرت شدة المرض باستعمال الدليل المرضي المكون من (5) درجات والموصوف من قبل Al.Hashimy (2011) حيث إن:

0= النبات سليم، ولا توجد أعراض ظاهرية على الجذور والأجزاء الهوائية.

1 = تعفن 25 % من المجموع الجذري وقاعدة الساق مع تلون بني واصفرار الأوراق القريبة من قاعدة الساق.

2 = تعفن 50 % من المجموع الجذري وقاعدة الساق مع ظهور تلون بني داكن وذبول أكثر من 50 % من الأوراق.

3 = تعفن 75 % من المجموع الجذري وقاعدة الساق مع تلون بني مسود وذبول جميع الأوراق.

4= تعفن المجموع الجذري بالكامل وموت النبات بالكامل.

وحسبت النسبة المئوية لشدة المرض حسب معادلة Mckinney (1923).

النتائج والمناقشة

تشخيص مسبب مرض التعفن الفحمي

أظهرت نتائج العزل والتشخيص وجود (11) نوعًا من الفطريات المجهرية تعود إلى (8) أجناس وهي *Alternaria alternata* و*Aspergillus flavus* و*A. japonicus* و*Aspergillus niger* و *Cladosporium cladosporioides* و *Fusarium moniliforme* و *F. oxysporum* و *Macrophomina phaseolina* و*Mucor sp* و*Pencillium sp*. و*Rhizopus sp*. مع سيادة الفطر Mp؛ إذ ظهر في جميع العينات بمعدل نسبة تكرار 53.23 % (جدول 1).

كونت عزلات الفطر Mp على الوسط الزرعي PDA غزلاً فطريًا تدرج لونه بمرور الوقت من الأبيض إلى البني المسود، كما كونت أجسام حجرية Microsclerotia سوداء أهليليجية، بيضوية، كروية أو غير منتظمة الشكل (شكل 2) والتي تعد وحدات تكاثر لا جنسية للفطر ينتجها عادةً على أنسجة النباتات المصابة (Sutton, 1980: Raut and Ingle, 1989).

إن انتشار الفطر Mp في حقول زراعة الفلفل قد يعود إلى استعمال بذور حاملة للمسبب المرضي ولا سيما أنها من الفطريات المنتقلة بالبذور (Khan, 2007) أو لعدم التخلص من بقايا النباتات المصابة في التربة والتي بدورها تشجع الفطر على البقاء، ولعل البيئة السائدة في معظم مناطق زراعة المحصول كارتفاع درجات الحرارة وانخفاض مستوى رطوبة التربة من أسباب زيادة كثافة المسبب المرضي (Kendig *et al*., 2000).

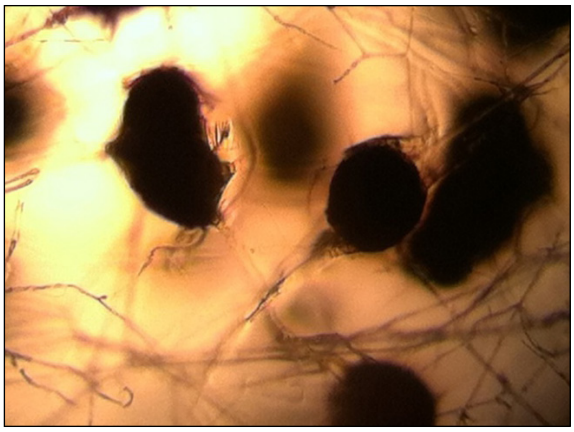
جدول (1): الفطريات المرافقة لجذور نباتات الفلفل المريضة مع نسب ظهورها وتكرارها في العينات

اسم الفطر	معدل الظهور في العينات (%)	معدل التكرار في العينات (%)
Alternaria alternata (Fres.) Keissler	35.48	8.87
Aspergillus flavus Link ex Gray	19.35	4.84
A. japonicas var. aculeatus	9.68	2.42
A. niger Van Tieghem	41.94	16.13
Cladosporium cladosporioides (Fresen.) G.A. de Vries	16.13	4.03
Fusarium moniliforme J. Sheld	19.35	7.26
F. oxysporum Schlesht.	29.03	13.71
Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid	100.00	53.23
Mucor sp.	15.13	4.03
Pencillium sp.	48.39	20.16
Rhizopus sp.	32.26	16.13

اختبار إمراضية عزلات الفطر *M. phaseolina* على بذور الفلفل

أظهرت نتائج اختبار إمراضية (23) عزلة للفطر Mp على بذور الفلفل التباين في مقدرتها الإمراضية؛ إذ تراوحت نسبة الإنبات في معاملاتها بين 12–75 % (جدول 2)، مع تفوق العزلة Mbs-3 التي بلغت نسبة الإنبات في معاملاتها 12 %. إن التباين في المقدرة الإمراضية بين هذه العزلات قد يعزى إلى التغاير الوراثي في جيناتها، وقد أشار Purkayastha *et al.* (2004) إلى وجود علاقة بين سرعة نمو الفطر ومقدرتها الإمراضية؛ إذ إن العزلات سريعة النمو وذات الإنتاج الوافر من الأجسام الحجرية تكون أكثر إمراضية مقارنة بالعزلات بطيئة النمو.

وقد يعود هذا التباين إلى الاختلاف في مقدرة الفطر على إنتاج السموم الفطرية؛ فالعزلة المنتجة للسم Phaseolinone تكون أكثر إمراضية من العزلة غير المنتجة (Suchandra *et al.*, 2000).



شكل (2): الأجسام الحجرية Microsclerotia للفطر *M. phaseolina* على الوسط الزرعي PDA (X40)

جدول (2): الكشف عن العزلات الممرضة للفطر *M. phaseolina* باستعمال بذور الفلفل

رمز العزلة	نسبة الإنبات (%)	رمز العزلة	نسبة الإنبات (%)
المقارنة	100	Mgs-4	64
Mbs-1	32	Mks-1	28
Mbs-2	70	Mks-2	44
Mbs-3	12	Mks-3	66
Mbs-4	66	Mks-4	52
Mbs-5	61	Mks-5	42
Mbs-6	43	Mks-6	51
Mbs-7	69	Mks-7	59
Mbs-8	70	Mks-8	75
Mgs-1	45	Mks-9	32
Mgs-2	62	Mks-10	35
Mgs-3	48	Mks-11	33
6.3 = LSD (0.05)			

* كل رقم يمثل معدلاً لأربعة مكررات

Mbs= عزلات بابل، Mgs = عزلات بغداد ، Mks= عزلات كربلاء

اختبار المقدرة التضادية لعوامل المكافحة الأحيائية ضد الفطر الممرض مختبريًّا

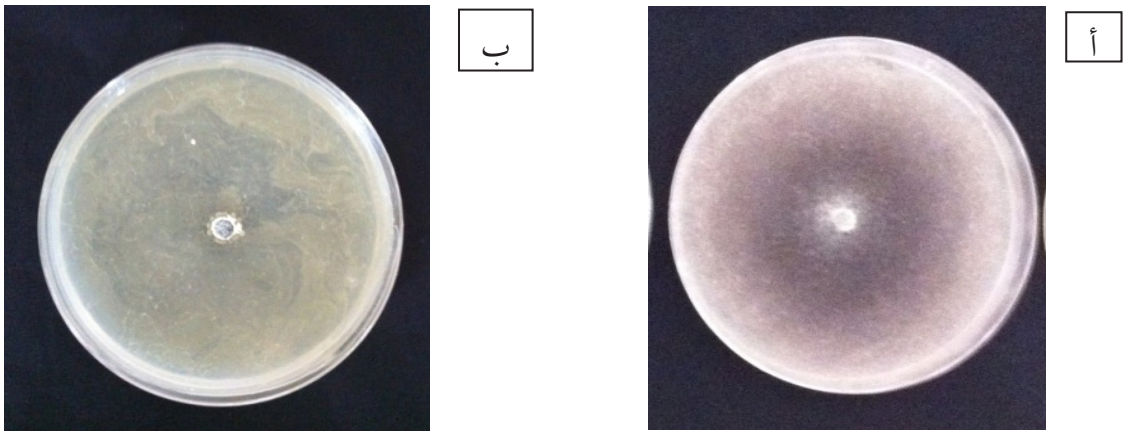
أظهرت نتائج اختبار المقدرة التضادية لعوامل المقاومة الحيوية *A. chroococcur* (Ac) و *A. brasilense* (Ab) و *P. putida* (Pp) و *E. cloacae* (Ec) و *S. odorifera* (So) ضد عزلة الفطر الممرض Mbs-3 تفوق معاملة اللقاح الخماسي Ac+Ab+Pp+Ec+So بفرق معنوي عن

بقيـة المعامـلات؛ إذ بلغـت النسـبة المئويـة للتثبيـط في معاملاتهـا 100.00 % قياسًـا بمعاملـة المقارنـة التـي مـلأت الطبـق بعـد (7) أيـام (جـدول 3 وشـكل 3). تلتهـا معاملتـا بكتيريـا Ec و Pp؛ إذ بلغـت نسـبة التثبيـط فيهـما 72.22 %، 66.67 % عـلى التتابـع. وتعـود القابليـة التضاديـة للأحيـاء المجهريـة النافعـة إلى مجموعـة مـن الآليـات والسـلوك الأيـضي كإنتـاج المضـادات الحيويـة والمركبـات المخلبيـة الفعالـة حيويًـا أو مـن خـلال المنافسـة على الغـذاء والمكان (Haggag and Abo Sedera, 2000: Validov *et al.*, 2005).

جدول (3): تقييم المقدرة التضادية لعوامل المكافحة الحيوية ضد الفطر الممرض مختبريًا

المعاملة	التثبيط (%)*
Mbs-3 بمفرده	0.00
Ac + Mbs-3	63.89
Ab + Mbs-3	59.72
Ec + Mbs-3	72.22
Pp + Mbs-3	66.67
So + Mbs-3	56.94
(Ac+Ab+Ec+Pp+So) +Mbs-3	100.00
LSD (0.05)	1.23

* كل رقم يمثل معدلاً لأربعة مكررات



شكل (3): المقدرة التضادية لعوامل المقاومة الحيوية *A. chroococcur* و *A. brasilense* و *P. putida* و *E. cloacae* و *S. odorifera* ضد عزلة الفطر الممرض Mbs-3 على الوسط الزرعي PDA
أ. معاملة (Ac+Ab+Ec+Pp+So) + Mbs-3
ب. معاملة المقارنة

تقييـم كفـاءة عوامـل المكافحـة الحيويـة في مكافحـة المـرض تحـت ظـروف البيـت الزجاجـي

أظهـرت النتائـج أن جميـع عوامـل المكافحـة الحيويـة المستخدمة في التجربـة حققـت زيـادة معنويـة في نسـبة إنبـات بـذور الفلفـل تحـت ظـروف البيـت الزجاجي؛ إذ تراوحـت نسـبة الإنبـات في معاملاتهـا بـين 87.50– 100.00 % قياسًـا إلى معاملـة المقارنـة السـالبة (الفطـر بمفـرده) التـي بلغـت 60.00 % (جـدول 4).

كـما بينـت النتائـج تفـوق معاملـة اللقـاح الخـماسي Ac+Ab+Pp+Ec+So عـلى بقيـة المعامـلات في خفـض النسـبة المئويـة للمـرض وشـدته؛ إذ بلغـت في معاملاتهـا 0 % قياسًـا إلى معاملـة المقارنـة السـالبة التـي بلغـت فيهـا نسـبة المـرض وشـدته 97.50 % و 74.75 % عـلى التتابـع، وقـد يعـزى ذلـك إلى تداخـل آليـات البكتيريـا الجذريـة في خفـض كثافـة المسـبب المـرضي وفعاليتـه ومكافحتـه سـواءً بالطـرق المبـاشرة؛ كالسـيطرة عـلى مصـادر الغـذاء والتنافـس عـلى المـكان وتحسـين معايـير نمـو النبـات مـن خـلال زيـادة جاهزيـة العنـاصر الغذائيـة الموجـودة في التربـة وإنتـاج Sideropher والمضـادات الحيويـة، أو بطريقـة غـير مبـاشرة مـن خـلال تثبيـط نمـو وتكاثـر المسـبب المـرضي (Kim *et al.*, 2012). كـما حققـت العـزلات البكتيريـة عـلى انفـراد خفضًـا في نسـبة المـرض وشـدته تراوحـت في معاملاتهـا بـين 47.50 – 62.50 %، 30.50 – 43.00 % عـلى التتابـع، إلا أنهـا لم تختلـف فيـما بينهـا معنويًـا. كـما حققـت جميـع عوامـل المكافحـة

المستخدمة زيادة معنوية في معايير نمو النباتات متمثلةً بالوزن الجاف؛ إذ تراوح معدل الوزن الجاف في المعاملات الملوثة بالفطر الممرض بين (1.04–2.15غم/ نبات) قياسًا إلى معاملة المقارنة السالبة التي بلغت (0.88 غم/ نبات)، وكان أعلى معدل وزن جاف في معاملة اللقاح الخماسي؛ إذ بلغ (2.15 غم/ نبات).

جدول (4) تأثير عوامل المكافحة الأحيائية في مكافحة مسبب مرض التعفن الفحمي لنباتات الفلفل

المعاملة	نسبة الإنبات (%)	نسبة المرض (%)	شدة المرض (%)	الوزن الجاف (غم/ نبات)
المقارنة الموجبة	100.00	0.00	0.00	1.66
Mbs-3	60.00	97.50	74.75	0.88
Mbs-3+Ac	90.00	57.50	37.50	1.17
Mbs-3+Ab	92.50	52.50	32.50	1.04
Mbs-3+Ec	95.00	47.50	30.50	1.39
Mbs-3+Pp	87.50	57.50	34.75	1.11
Mbs-3+So	95.00	62.50	43.00	1.04
(Ac+Ab+Ec+Pp+So) +Mbs-3	100.00	0.00	0.00	2.15
Ac	100.00	0.00	0.00	1.99
Ab	100.00	0.00	0.00	1.84
Ec	100.00	0.00	0.00	2.05
Pp	100.00	0.00	0.00	1.87
So	100.00	0.00	0.00	2.02
LSD (0.05)	0.88	19.23	13.51	0.40

* كل رقم يمثل معدلاً لأربعة مكررات

وتتفق هذه النتائج مع ما وجده El.Barougy *et al*. (2009) ؛ إذ أثبتت دراستهم دور بكتيريا *Azotobacter spp* في تثبيط نمو الفطر الممرض *M. phaseolina* المسبب لمرض التعفن الفحمي لمحصول فول الصويا، وأثرت إيجابيًّا في زيادة نسبة الإنبات.

وتعد الأنواع البكتيرية التابعة لجنس *Azotobacter* و*Azospirillum* من أكثر الأحياء المجهرية حرة المعيشة تثبيتًا للنتروجين في الطبيعة (Hayat *et al*., 2010). وقد أثبت Al.Samarai and Rahi (2006) عند معاملة بذور الطماطم ببكتيريا *Azotobacter chroococcum* وبكتيريا *Azospirillium brasilense* أن نسبة إنبات البذور قد ازدادت معنويًّا، وكذلك معايير نمو النباتات، واستنتج الباحثان أن استخدام هذه الأنواع البكتيرية يعطي أفضل النتائج بسبب دورها الكبير في تغيير وتوزيع تراكيز منظمات النمو.

المراجع

Al.Hashimy, M. N. 2011. Integration in controlling of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in cantaloupe. Department of Plant Protection, College of Agriculture. University of Baghdad, Baghdad, Iraq.

Al.Samarai, I. K., and Rahi, H. S. 2006. Effects of the inoculation by *Azotobacter* and *Azospirillum* in absorbing some nutrient elements and botanical hormones concentration and tomato seedling grow. Iraqi Agricultural Science Journal. 37(3): 27-32

Arora, N. K., Kang, S. C., and Maheshwari, D.K. 2001. Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. Current Science. 81(6): 376-677.

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

Hassan, A. A. 2001. Pepper and Eggplant Production. Arabic House of Publication and Distribution, Egypt. 336 pp.

Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., and Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Ann Microbiol. Springer – Verlag and the University of Milan. P. 1-20.

Hussein, S. N. 2014. Some aspects of integration to control root and crown root disease of watermelon. Department of Plant Protection. College of Agriculture, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.

Hussein, S. N., and Juber, K. S. 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. J. Int. Agr. Inno. and Res. 3: 974-978.

Janssen, A. M., Scheffer, J. C., and Baerheim-Svendsen, A. 1986. Antimicrobial activity of essential oil: 1976-86 literature review aspect of test methods. Planta Med.53: 395-398.

Kelley, T., and Boyhan, G. 2006. Commercial Pepper Production Handbook. University of Georgia, College of Agricultural and Environmental Sciences, Center for Agribusiness and Economic Development, GA.

Kendig, S. R., and Rupe, J. C. 1990. Influence of two soybean cultivars on soil population densities of *Macrophomina phaseolina*. Phytopathology (Abstract). 80: 1029.

Kendig, S. R., Rupe, J. C., and Scott, H. D. 2000. Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. Plant Disease. 84: 895-900.

Khan S. N. 2007. *Macrophomina phaseolina* as causal agent for charcoal rot of sunflower. Mycopath. 5(2): 111-118.

Kim, H. S., Sang, M. K., Jung, H. W., Jeun, Y. C., Myung, I. S., and Kim, K. D. 2012. Identification and characterization of *Chryseobacterium wanjuense* strain KJ9C8 as a biocontrol agent against *Phytophthora* blight of pepper. Crop Prot. 32: 129-137.

Barrata, T. M., and Dorman, H. J. D. 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. Flavour Fragr. J. 13: 335-244

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

Booth, C. 1977. *Fusarium*: Laboratory Guide to the Identification of the Major Species. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK, 58 pp.

Choudhary, D. K., and Johri, B. 2008. Interaction of *Bacillus* spp. and plants with special reference to induced systemic resistance (ISR). Microbiol. Res. 164: 493-513.

CSO, Central Statistical Organization. 2016. Report of the Secondary Production and Vegetables According to the Provinces of 2015. Central Organization for Statistics, Ministry of Planning. Iraq. Pp 37.

Csondes, I., Kadlicsko, S., and Cseha, A. 2007. Susceptibility of different pepper varieties to *Macrophomina phaseolina* in field trials. Cereal Research Communications. 35: 333-336.

Dewan, M. M. 1989. Identity and frequency of occurrence of fungi in root of wheat and rye grass and their effect on take–all and host growth. Ph. D. Thesis, Univ. West Australia.

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

Eilenber, J., Hajek, A., and Lomer, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. BioControl. 46: 387-400.

El.Barougy, E., Awad, N. M., Turky, A. S., and Hamed, H. A. 2009. Antagonistic activity of selected strains of rhizobacteria against *Macrophomina phaseolina* of soybean plants. American- Eurasian J. Agric& Environ. Sci. 5(3): 337-347.

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

Haggag, W. M., and Abo Sedera, S. A. 2000. Influence of iron sources and siderophores producing *Pseudomonas fluorescens* on crown rot disease incidence and seed contamination of peanut with pathogenic Aspergilla Egypt. Phytopathology. 28:1-16.

Rosskopf, E. N., Chellemi, D. O., Kokalis-Burelle, N., and Church, G. T. 2005. Alternatives to methyl bromide, Florida perspective. Online Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2005-1027-01-RV.

Suchandra, S., Santosh, K., Mishra, H., Kazi, A. I., and Siddiqui, Z. A. 2000. A virulent mutants of *Macrophomina phaseolina* and *Aspergillus fumigates* initiate infection in *Phaseolus mungo* in the presence of phaseolinone, leramisole gives protection. J. Biosci. 25(1): 73-80.

Sun, S., Wang, X., Zhu, Z., Wang, B., and Wang, M. 2015. Occurrence of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*, an emerging disease of adzuki bean in China. J. of Phytopathology. doi: 10.1111/jph.12413.

Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes. Fungi Imperfect with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 696 pp.

Validov, S., Mavrodi, O., Dela Fueute, L., Boronin, A., Weller, D., Thomashow, B., and Mavrodi, D. 2005. Antagonistic activity among 2,4–diacetylpholorolucinol producing *fluorescens Pseudomonads* SP. FEMS Microbiology Letters. 242(2): 249–256

.

McKinney, H. H. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. J. Agr. Res. 26: 195-217.

Muchero, W., Ehlers, J. D., Close, T. J., and Roberts, P. A. 2011. Genic SNP markers and legume synteny reveal candidate genes underlying QTL for *Macrophomina phaseolina* resistance and maturity in cowpea. BMC Genomics. 12(8): 1-14.

Purkayastha, S., Kaur, B., Dilbaghi, N., and Chaudhury, A. 2004. Cultural and pathogenic variation in the charcoal rot pathogen from cluster bean. Ann. Agri. Boil. Res. 9: 217-221.

Purkayastha, S., Kaur, B., Dilbaghi, N., and Chaudthury, A. 2006. Characterization of *Macrophomina phareolina*, the charcoal rot pathogen of cluster bean, using conventional techniques and PCR based molecular markers. Plant Pathology. 55: 16-106.

Raut, J. C., and Ingle, R. W. 1989. Variations in isolates of *Rhizoctonia bataticola*. Indian, Phytopathology. 42(4): 506-508.

Roberti, R., Veronesi, A., and Flamigni, F. 2012. Evaluation of microbial products for the control of zucchini foot and root rot caused by *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1. Phytopathol. Mediter. 51: 317-331.

Biological Control of the Charcoal Rot Disease of Pepper Caused by *Macrophomina phaseolina*

Safaa Neamat Hussein[1] and Thekra Atta Ibrahim[2]

(1) Department of Environmental Engineering, College of Engineering
University of Al.Mustansiriayah
(2) Department of Biology, College of Education for Pure Science, University of Diyala

Received 21 September 2016 - Accepted 2 November 2016

ABSTRACT

The charcoal rot disease, caused by *Macrophomina phaseolina* (Mp), is a harmful plant diseases that affect a wide range of the plant species. Recently, economic losses were observed in various growing area of pepper. This study aimed to isolate, identify the causing agent of the disease in various pepper fields in middle and south Iraq, and control it biologically. Result of isolation indicated the presence of number of the fungi dominated by Mp. The later appeared in all the samples with frequency of 53.23%. Isolates of the Mp showed varied in their pathogenicity on pepper seeds *in vitro*. Isolate Mbs-3reduced seed germination to 12% compared to 100% for the control. Evaluation of the antifungal treatments was conducted for the *rhizobacteria* isolates of *Azotobacter chroococcur* (Ac), *Azospirillum brasilense* (Ab), *Enterobacter cloacae*(Ec)*, Pseudomonas putida* (Pp) and *Serratia odorifera* (So) against the pathogen *in vitro.* All bio-agents significantly reduced the growth of the pathogen on the potato dextrose agar (PDA). Treatment of the penta-inoculum of Ac+Ab+Ec+Pp+So was superior which exhibited 100% percentage of inhibition compared to the control after 7 days. Under greenhouse conditions, all the bio-agents significantly increased the percent of the seed germination, which ranged between 87.5-100.0% compared to the negative control, which was 60.0%. Treatment of the penta-inoculum was superior in controlling the disease as it exhibited 0% percentage of disease incidence and severity compared to negative control, which were 97.5%, 74.7% respectively. All bio-agents significantly increased growth criteria represented by dry weight of the plants.

Key Words: Bio-agents, Green house infection, *In* vitro infection.