



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة كربلاء - كلية الزراعة  
قسم وقاية النبات

## التشخيص الجزيئي للبكتريا المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في محافظة كربلاء وبابل ومقاومتها باستعمال بعض العوامل الاحيائية و المركبات النانوية

رسالة مقدمة الى  
مجلس كلية الزراعة / جامعة كربلاء  
وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير  
في العلوم الزراعية - وقاية النبات

من قبل

علاء طالب سالم العامري

بإشراف

أ.د. رجاء غازي عبدالمحسن الجنابي

2021م

1443هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قَالُوا تَبِعَانِي لَأَجْعَلَ لَنَا مِنْهُ مَا مَخْلُوعًا

إِنَّهُمْ أَكْفَرُ مِنْكُمْ وَاللَّهُ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ ﴿٣٢﴾

صِرَاحُ اللَّهِ الْعَلِيِّ الْعَظِيمِ

سورة البقرة: الآية 32

## اقرار المشرف

اشهد ان إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ (التشخيص الجزيئي للبكتريا المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في محافظتي كربلاء وبابل ومقاومتها باستعمال بعض العوامل الاحيائية و المركبات النانوية). تم تحت إشرافي في قسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة كربلاء ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير في العلوم الزراعية - وقاية النبات .

التوقيع :

اسم المشرف : د. رجا غازي عبد المحسن الجنابي

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان : كلية الزراعة / جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2021

## توصية رئيس قسم وقاية النبات

بناءً على التوصيات المقدمة من الأستاذ المشرف أرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الاسم : د. ياسر ناصر حسين الحميري

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان: كلية الزراعة / جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2021



لا فينا العظيم محمد صلى الله عليه وآله وسلم

لا الأئمة الأطهار صلوات الله وسلامه عليهم أجمعين

لا روح أُنبي ..... أَنْتِ فِي الْقَلْبِ

لا روح أُمي ..... أَنْتِ الْغَالِيَة

لا اخواني وزوجتي ..... هَدَيْتَنِي مِنَ اللَّهِ تَعَالَى

اهدني عمرة جهدي المتواضع فزلا

علاء

## شكر و تقدير

الحمد لله الواحد الأحد الفرد الصمد الأول قبل وجود كل شيء و الباقي بعد فناء كل شيء و الصلاة و السلام على اعظم خلق الله الرسول الأكرم و النبي الأعظم خاتم الأنبياء والمرسلين سيدنا و حبيبنا ابي القاسم محمد صلوات الله و سلامه عليه و اله الطيبين الطاهرين .

اتقدم بفائق الشكر و التقدير الى استاذتي الفاضلة الأستاذة الدكتورة رجاء غازي عبد المحسن التي تفضلت بالإشراف على اعداد هذه الرسالة و لجهودها المستمرة و توجيهاتها القيمة خلال مدة البحث.

الشكر و التقدير الى السادة رئيس وأعضاء لجنة المناقشة المحترمون لتفضلهم بقبول قراءة الرسالة ومناقشة محتوياتها بعد تجشّمهم عناء السفر .

ويسرني كذلك ان اتقدم بالشكر الجزيل الى عمادة كلية الزراعة المتمثلة بالأستاذ الدكتور ثامر كريم خضير و رئاسة قسم وقاية النبات المتمثلة بالأستاذ المساعد ياسر ناصر حسين لما ابدياه من مساندة كان لها الأثر الكبير في اكمال متطلبات البحث.

كما اتقدم بالشكر و الامتنان الى الأستاذ المساعد مشتاق طالب محمد الأستاذ سلام مرزة والأستاذ الدكتور زينب عليوي و الأستاذ المساعد الدكتور عدنان عبد الجليل لهوف و الأستاذ المساعد الدكتور عقيل نزال الكعبي و ا.م.د. كاظم محمد عبد الله و الأستاذ المساعد الدكتور محمد هادي و الأستاذ الدكتور حميد خشان والأستاذ الدكتور عباس علي العامري والأستاذ المساعد طه موسى محمد السويدي الأستاذ المساعد إبراهيم لفته كاظم الراجحي و الأستاذ المساعد الدكتور علي عبد الحسين كريم و المدرس زينب عبد الأمير حسين عباس الاسدي و المدرس الدكتور محمود ناصر جواد و المدرس حسين علي باقر الربيعي والى الأستاذ محمد سعدون محمد .

واشكر زملائي في الدراسات العليا والتمس العذر لكل من ساعدني ولو بالشيء البسيط وفاتني ذكر اسمه . وفي الختام لزاماً علي ان اشكر اعز الناس عائلتي الصغيرة لتحملهم معي عبء الدراسة و لدعواتهم الصادقة.

علاء

## الخلاصة

هدفت هذه الدراسة الى عزل وتشخيص البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في بعض حقول ومخازن واسواق محافظتي كربلاء وبابل ، واختبار مقدرتها الامراضية ، و كذلك اختبار حساسية عدد من اصناف البطاطا للإصابة بهذه البكتريا مع اختبار المدى العائلي لها، وتقييم فعالية عدد من عوامل المقاومة الاحيائية والمبيدات الكيميائية والمواد النانوية والتكامل بينها في مكافحتها مختبرياً وتحت ظروف البيت البلاستيكي

لقد تم الحصول على 15 عزلة بكتيرية من الدرنات المصابة بمرض التعفن الطري ومن جميع العينات التي جمعت من بعض حقول ومخازن واسواق محافظتي كربلاء وبابل. واثبت اختبار المقدر الامراضية على اوراق التبغ وكذلك على شرائح البطاطا ان جميع العزلات البكتيرية قادرة على احداث المرض وتفوقت العزلات Pcc1، Pcc6، Pcc9، Pcc11، Pcc13 معنوياً على العزلات الاخرى في سرعة ظهور الاعراض على اوراق نبات التبغ، وفي قابليتها الامراضية على شرائح البطاطا اذ بلغ قطر النسيج المصاب 4.7 سم<sup>3</sup>، 4.37 سم<sup>3</sup>، 4.5 سم<sup>3</sup>، 4.37 سم<sup>3</sup>، 4.5 سم<sup>3</sup> على التوالي.

أظهرت نتائج الاختبارات المظهرية والكيموحيوية ان البكتريا هي *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* وتم تأكيد هذا التشخيص بواسطة تحليل تسلسلات القواعد النايتروجينية لنواتج الحامض النووي المضاعفة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR-amplified products) لمنطقة 16S و باستعمال برنامج (Basic Local BLAST Alignment Search Tool) ان العزلة Pcc1 تعود للبكتريا *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* وهي ذات اختلاف وراثي مع العزلات التابعة لهذه الانواع و المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية (National Center for Biotechnology Information، NCBI) ، لذا تم تسجيلها بأسماء الباحثين و تحت رقم الادخال MW453066.

اظهر اختبار حساسية عدد من اصناف البطاطا للإصابة بالبكتريا المسببة للتعفن الطري العزلة Pcc1 ان الصنف Arezona كان اكثر الاصناف حساسية اذ تفوق معنوياً على الأصناف الأخرى و بلغ حجم النسيج المتعفن 8.60 سم<sup>3</sup> ، وبينت نتائج المدى العائلي ان للعزلة البكتيرية Pcc1 القدرة على احداث المرض على البطاطا، الباذنجان، الشلغم ، الشمندر، القرع ، الخيار ، الفجل ، الجزر وبنسب متفاوتة.

بينت نتائج اختبار القدرة التضادية بين عدد من العوامل الاحيائية والبكتريا المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا مختبريا وعلى شرائح البطاطا تفوق الفطر *Trichoderma harzianum* معنوياً على العوامل الاخرى وبلغت النسبة المئوية للتثبيط 86.41% ، 81.77% على التوالي.

اوضحت نتائج اختبار كفاءة عدد من المبيدات الكيميائية ضد البكتريا *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* (وبالتراكيز الموصى بها ) تحقيق نسبة تثبيط بلغت 100% للمبيدات Beltanol ، Ganger ، Goldston متفوقة معنوياً على المبيد Nordox والذي بلغت نسبة تثبيطه للممرض 21.56% .و كما تفوق اوكسيد المغنيسيوم النانوي في تثبيطه للبكتريا الممرضة على اوكسيد الزنك النانوي في الوسط الزراعي Nutrient Agar ولجميع التراكيز المستخدمة.

واظهرت نتائج اختبار التكامل في مكافحة البكتريا *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* في ظروف البيت البلاستيكي تفوق معاملات التي تجمع بين اكثر من عامل في خفض النسبة المئوية للإصابة الى 0.00% ، واظهرت معاملة Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + T.h.+ Beltanol +Goldstone كفاءة عالية في زيادة معدلات فعالية انزيم البيروكسديز ،تراكم الفينولات الكلية، كمية الكلوروفيل الكلية، الوزن الطري والجاف للمجموع الخضري ،عدد ووزن الدرنات القابلة للتسويق على التوالي وبمعدلات بلغت 41.02 ، 243.78 ، 50.09 ، 937.67 غم ، 88.67 غم ، 9.00 درنة ، 974.08 درنة وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة المصابة المجرحة وغير المجرحة .



## قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	ت
1	المقدمة	اولاً
4	مراجعة المصادر	ثانياً
4	الاهمية الاقتصادية لمرض التعفن الطري	1.2
5	البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري	2.2
6	المدى العائلي للبكتريا المسببة لمرض التعفن الطري	3.2
7	تصنيف البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري	4.2
7	دورة مرض التعفن الطري	5.2
8	تشخيص البكتريا <i>P.carotovorum subsp. carotovorum</i> المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا	6.2
8	التشخيص الكيموحيوي	1.6.2
9	التشخيص الجزيئي للبكتريا <i>P. carotovurum subsp. carotovorum</i>	2.6.2
10	طرق مكافحة لمرض التعفن الطري	7.2
10	المكافحة الأحيائية	1.7.2
11	الفطر <i>Trichoderma harzianum</i>	1.1.7.2
13	البكتريا الجذرية المحفزة للنمو النباتي Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)	2.1.7.2
14	دور البكتريا <i>Azotobacter chroococcum</i> في المقاومة الحيوية لمسببات امراض النبات	2.1.7.2 1
16	المكافحة باستخدام تقنية النانو	2.7.2
18	المكافحة الكيماوية لمرض التعفن الطري	3.7.2
20	المواد وطرائق العمل	ثالثاً
21	جمع العينات	2.3
21	عزل وتنقية المسبب المرضي	3.3
22	اختبار القدرة الإراضية لعزلات البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا	4.3
22	اختبار فرط الحساسية على التبغ Hypersensitive Reaction Test	1.4.3
22	زراعة و تحضير نباتات التبغ	2.1.4.3
22	تحضير اللقاح البكتيري	3.1.4.3
23	تلقيح نباتات الاختبار	4.1.4.3
23	اختبار القدرة الامراضية على شرائح البطاطا	2.4.3

23	تشخيص البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري	5.3
24	الصفات المجهرية والمظهرية للعزلات البكتيرية	1.5.3
24	قابلية النمو في بعض الاوساط الزرعية التفرقية	2.5.3
24	طبيعة النمو ولونه على وسط Yeast extract – dextrose CaCO <sub>3</sub>	1.2.5.3
24	طبيعة النمو على وسط D-3 Agar	2.2.5.3
25	طبيعة النمو على وسط Kings Medium (KB)	3.2.5.3
25	وسط البكتات وكريستيل فايوليت (CVP) – Crystal violet Pectate medium	4.2.5.3
25	الاختبارات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة	3.5.3
25	إختبار الكاتليز Catalase	1.3.5.3
26	إختبار الأوكسيداز Oxidase	2.3.5.3
26	إختبار أحمر المثيل Methyl Red	3.3.5.3
26	إختبار فوكس - بروسكار Voges - Proskauer	4.3.5.3
27	إختبار فنيل ألانين Phenylalanine	5.3.5.3
27	تحلل النشا Starch hydrolysis	6.3.5.3
27	تميع الجيلاتين Gelatin liquefaction	7.3.5.3
28	النمو في وسط Nutrient Broth	8.3.5.3
28	إختبار النمو في درجة حرارة 35 درجة مئوية	9.3.5.3
28	إختبار النمو في وسط حاوي على 5% NaCl	10.3.5.3
28	التشخيص الجزيئي للعزلة البكتيرية Pcc1 باستعمال تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وتحديد التسلسل القواعد النيتروجينية	6.3
28	استخلاص الحامض النووي (DNA)	1.6.3
30	قياس تركيز و نقاوة مستخلص الحامض النووي (DNA)	2.6.3
30	استخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لمضاعفة الجين 16S rRNA	3.6.3
31	تحضير تفاعلات مضاعفة الجين 16s rRNA	4.6.3
32	الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز	5.6.3
33	تحليل تسلسل القواعد النيتروجينية للحامض النووي (DNA) للعزلة البكتيرية Pcc1	6.6.3
33	دراسة القرابة الوراثية للعزلة البكتيرية Pcc1 المشخصة	7.6.3
33	حساسية اصناف البطاطا للبكتريا <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ومحتوى الاصناف من المادة الجافة و النشا وعنصر الكالسيوم	7.3
34	تقدير النسبة المئوية للمادة الجافة	1.7.3
34	النسبة المئوية للنشا في الدرنت	2.7.3
35	تقدير عنصر الكالسيوم	3.7.3

35	<i>P. carotovorum</i> subsp. العائلي للبكتريا (Pcc1) <i>carotovorum</i> المسببة التعفن الطري على البطاطا.	8.3
36	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> مكافحة البكتريا (العزلة Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا	9.3
37	إختبار القدرة التضادية للبكتريا <i>B.subtilis</i> و <i>A.chroococcum</i> والفطر <i>T.harzianum</i> ضد البكتريا <i>P. carotovorum</i> (Pcc1) <i>subsp. carotovorum</i> المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط الزراعي NA	1.9.3
37	إختبار القدرة التضادية للبكتريا <i>B.subtilis</i> و <i>A.chroococcum</i> والفطر <i>T.harzianum</i> ضد البكتريا <i>P. carotovorum</i> (Pcc1) <i>subsp. carotovorum</i> المسببة لمرض التعفن الطري على شرائح البطاطا مختبرياً	2.9.3
38	تقييم كفاءة المبيدات الكيميائية Beltanol ، Ganger ، Goldstone و Nordox في البكتريا <i>P. carotovorum</i> (العزلة Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط NA	3.9.3
39	تأثير المبيدين الكيميائيين Beltanol و Goldstone في نمو عزلات الفطر <i>T.harzianum</i> و البكتريا <i>A.chroococcum</i> مختبرياً	4.9.3
39	تقييم كفاءة أكسيد المغنيسيوم النانوي (MgONPs) وأكسيد الزنك النانوي (ZnONPs) في البكتريا <i>P. carotovorum</i> (Pcc1) <i>subsp. carotovorum</i> المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط NA	5.9.3
40	تقييم كفاءة الفطر <i>T.harzianum</i> والبكتريا <i>A. chroococcum</i> واوكسيد المغنيسيوم النانوي والمبيدين الكيميائيين Beltanol وGoldston والتكامل بينهم في مقاومة البكتريا <i>carotovorum</i> <i>P. carotovorum</i> (Pcc1) تحت ظروف البيت البلاستيكي	10.3
42	النسبة المئوية للإصابة Percentage of infection	1
42	تقدير فعالية انزيم البيروكسيداز (POD) Peroxidase	2
42	تقدير فعالية الفينول الكلي	3
43	الوزن الطري والجاف للمجموع الخضري	4
43	مؤشرات الحاصل الكمية	5.10.3
43	عدد درنات النبات القابلة وغير القابلة للتسويق (درنة. نبات-1)	1
43	وزن درنات النبات القابلة وغير القابلة للتسويق (غم. نبات-1)	2
43	التصميم التجريبي	11.3
44	النتائج والمناقشة	رابعاً
44	جمع العينات	1.4

44	اختبار القدرة الامراضية لعزلات البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري	2.4
44	Hypersensitive Reaction اختبار فرط الحساسية على التبغ Test	1.2.4
45	اختبار الامراضية على شرائح البطاطا	2.2.4
46	تشخيص البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري	3.4
46	الصفات المظهرية والمجهريه لعزلات البكتريا قيد الدراسة	1.3.4
47	قابلية النمو في بعض الاوساط الزرعية التفريقية	2.3.4
47	الاختبارات البايوكيميائية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة	3.3.4
48	التشخيص الجزيئي للعزلة البكتيرية <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> 1Pcc باستعمال تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وتحديد التسلسل القواعد النيتروجينية:	4.4
51	حساسية اصناف البطاطا للبكتريا <i>P. carotovorum</i> و <i>carotovorum</i> ومحتوى الاصناف من المادة الجافة و النشا وعنصر الكالسيوم	5.4
58	اختبار المدى العائلي للبكتريا <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (Pcc1) المسببة للتعفن الطري على البطاطا.	6.4
57	مكافحة البكتريا <i>Pectobacterium carotovorum</i> المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا	7.4
57	إختبار القدرة التضادية للبكتريا <i>A.chroococcum</i> و <i>B.subtilis</i> و الفطر <i>T.harzianum</i> ضد البكتريا <i>P. carotovorum</i> المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط الزرعى NA	1.7.4
58	إختبار القدرة التضادية للبكتريا <i>A.chroococcum</i> و <i>B.subtilis</i> و الفطر <i>T.harzianum</i> ضد البكتريا <i>P. carotovorum</i> المسببة لمرض التعفن الطري على شرائح البطاطا مختبريا	2.7.4
59	تقييم كفاءة المبيدات الكيميائية، Goldstone، Ganger، Beltanol و Nordox في البكتريا <i>P. carotovorum</i> (العزلة Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط NA	3.7.4
61	تأثير المبيدين الكيميائيين Goldstone و Beltanol في نمو عزلات الفطر <i>T.harzianum</i> و البكتريا <i>A.chroococcum</i> مختبرياً.	4.7.4
62	تقييم كفاءة أوكسيد المغنيسيوم النانوي (MgONPs) و اوكسيد الزنك النانوي (Zno) في البكتريا <i>P. carotovorum</i> (العزلة Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط NA	5.7.4
64	تقييم كفاءة الفطر <i>T.harzianum</i> و البكتريا <i>A. chroococcum</i> و اوكسيد المغنيسيوم النانوي و المبيدين الكيميائيين Beltanol	8.4

	Goldston والتكامل بينهم في مقاومة البكتريا <i>carotovorum</i> و <i>P. carotovorum</i> (Pcc1) تحت ظروف البيت البلاستيكي	
64	النسبة المئوية للإصابة Percentage of infection	1.8.4
68	فعالية انزيم البيروكسيداز Peroxidase (POD)	2.8.4
71	تراكم الفينولات الكلية	3.8.4
74	الوزن الطري والجاف للمجموع الخضري	4.8.4
76	عدد الدرناات القابلة وغير القابلة للتسويق	5.8.4
77	وزن الدرناات القابلة وغير القابلة للتسويق	6.8.4
<b>79</b>	<b>الاستنتاجات والتوصيات</b>	<b>خامساً</b>
79	الاستنتاجات	1.5
80	التوصيات	2.5
<b>81</b>	<b>المصادر</b>	<b>سادساً</b>
81	المصادر العربية	1.6
83	المصادر الاجنبية	2.6

### قائمة الجداول

الصفحة	عنوان الجدول	رقم الجدول
20	الاجهزة المستخدمة في الدراسة	1
21	المناطق التي جمعت منها عينات البطاطا المصابة بمرض التعفن الطري	2
31	صفات البادئ المستخدم في تشخيص البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا	3
31	مكونات وحجوم مزيج التفاعل انزيم البلمرة المتسلسل PCR	4
32	برنامج تضاعف الجين 16S rDNA بواسطة المضخم الحراري	5
36	العوامل المستخدمة في مقاومة البكتريا <i>P. carotovorum</i> المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا	6
46	الصفات المجهرية والمظهرية للبكتريا قيد الدراسة	7

47	طبيعة نمو العزلات البكتيرية قيد الدراسة في بعض الاوساط الزرعية الانتخائية والتفريقية	8
48	نتائج الاختبارات البايوكيميائية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة	9
56	اختبار المدى العائلي للبكتريا <i>P. carotovorum</i> (Pcc1) <i>carotovorum</i> subsp. المسببة التعفن الطري على البطاطا	10
59	القدرة التضادية للبكتريا <i>B.subtilis</i> و <i>A.chroococcum</i> والفطر <i>T.harzianum</i> ضد البكتريا <i>P. subsp.carotovorum</i> (Pcc1) <i>carotovorum</i> المسببة لمرض التعفن الطري على شرائح البطاطا مختبرياً	11
61	تأثير المبيدين الكيميائيين Beltanol و Goldstone في نمو عزلات الفطر <i>T.harzianum</i> و البكتريا <i>A.chroococcum</i> مختبرياً	12
63	تأثير تراكيز مختلفة من مادة أوكسيد المغنيسيوم النانوي (MgOPNs) و أوكسيد الزنك النانوي (ZnONPs) في تثبيط البكتريا <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (العزلة Pcc1) في الوسط NA	13
65	كفاءة الفطر <i>T.harzianum</i> والبكتريا <i>A. chroococcum</i> واوكسيد المغنيسيوم النانوي والمبيدين الكيميائيين Beltanol و Goldston والتكامل بينهم في خفض نسبة الاصابة بالبكتريا <i>carotovorum</i> <i>P. carotovorum</i> subsp. (Pcc1) تحت ظروف البيت البلاستيكي	14
69	تأثير تلقيح درنات البطاطا بالبكتريا الممرضة <i>carotovorum</i> subsp. <i>P. carotovorum</i> (Pcc1) وعوامل المكافحة على فعالية انزيم البيروكسيدز.	15
72	تأثير تلقيح درنات البطاطا بالبكتريا الممرضة <i>carotovorum</i> <i>P. carotovorum</i> (Pcc1) وعوامل المكافحة على الفينولات الكلية.	16
75	تأثير تلقيح درنات البطاطا بالبكتريا الممرضة <i>carotovorum</i> <i>P. carotovorum</i> (Pcc1) وعوامل المكافحة في الوزن الطري والجاف للمجموع الخضري	17

77	تأثير تلقيح درنات البطاطا بالبكتريا الممرضة ( <i>Pcc1 carotovorum</i> ) <i>P. carotovorum</i> وعوامل المكافحة على عدد الدرنات القابلة وغير القابلة للتسويق للنبات الواحد (درنة/ نبات <sup>1</sup> )	18
78	تأثير تلقيح درنات البطاطا بالبكتريا الممرضة <i>carotovorum</i> <i>P. carotovorum</i> ( <i>Pcc1</i> ) وعوامل المكافحة في وزن الدرنات القابلة وغير القابلة للتسويق للنبات الواحد (غم. نبات <sup>1</sup> ).	19

### قائمة الاشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
1	اختبار فرط الحساسية على أوراق النبات التبع المتسبب عن البكتريا <i>P. carotovorum</i>	44
2	اختبار القدرة الامراضية لعزلات البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري على شرائح درنات البطاطا	45
3	امراضية احدى العزلات البكتيرية الشديدة على شرائح درنات البطاطا	46
4	نتاج الحامض النووي (PCR products) المضاعف باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من البكتريا المعزولة في هذه الدراسة من درنات البطاطا المصابة.	49
5	بعض مواقع التشابه و الاختلاف بين تسلسل القواعد النيتروجينية لعزلة البكتريا <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> المشخصة في هذه الدراسة و تسلسلات القواعد النيتروجينية لنفس المنطقة الجينية (16SrRNA) لعزلات نفس البكتريا ( <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ) المسجلة سابقا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).	50
6	شجرة التحليل الوراثي (Neighbor-Joining tree)) تبين العلاقة الوراثية بين البكتريا <i>P. carotovorum</i> المعزولة في هذه الدراسة مع العزلات الاخرى العائدة لنفس النوع و المسجلة سابقا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية NCBI	50
7	حجم النسيج المتعفن الناتج عن اصابة عدد من اصناف البطاطا للإصابة بالبكتريا <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	52
8	تأثير اصابة عدد من اصناف البطاطا بالبكتريا <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> في النسبة المئوية للمادة الجافة	53
9	تأثير اصابة عدد من اصناف البطاطا بالبكتريا <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> في النسبة المئوية للنشأ	53

54	<i>P. carotovorum</i> subsp. تأثير اصابة عدد من اصناف البطاطا بالبكتريا في النسبة المئوية للكالسيوم	10
58	القدرة التضادية للبكتريا <i>B.subtilis</i> و <i>A.chroococcum</i> والفطر <i>P. subsp.carotovorum</i> ضد البكتريا <i>T.harzianum</i> <i>carotovorum</i> المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط الزرعي NA	11
60	تقييم كفاءة المبيدات الكيميائية Goldstone، Ganger، Beltanol و Nordox في البكتريا <i>P. carotovorum subsp. carotovorum</i> (العزلة Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط NA	12

### قائمة الملاحق

رقم الملحق	عنوان الملحق
1	السلالة Pcc1 المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية NCBI

## أولاً : المقدمة Introduction:

يُعد محصول البطاطا *Solanum tuberosum*, L التي تعود تصنيفياً الى العائلة الباذنجانية Solanaceae رابع محصول استراتيجي بعد القمح والذرة والرز (AL-Razaq وآخرون, 2018 و Shayaa و Hussein, 2019)، وثالث أهم محصول غذائي من حيث الاستهلاك العالمي، تستهلك درنات البطاطا بشكل مباشر في تغذية الإنسان وحيواناته كما تستعمل بشكل غير مباشر في الصناعات التحويلية بعد تجميدها أو تجفيفها (بوراس وآخرون, 2006). وقد أوصت منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة بشدة بالبطاطا كمحصول مهم للأمن الغذائي بسبب التحديات التي تواجه العالم نتيجة للزيادة الكبيرة في اعداد السكان والمشكلات ذات الصلة بالإمدادات الغذائية. يضاف الى ذلك يعتبر محصول البطاطا من محاصيل الخضر المهمة عالمياً لكونها مصدراً غذائياً غنياً بالطاقة, وهي مصدر مهم أيضاً للعديد من المكونات الغذائية اذ تحتوي على نسبة عالية من النشويات والسكريات والبروتينات والأحماض الأمينية و الأحماض العضوية والعناصر المعدنية والالياف وهي مصدر جيد للعديد من الفيتامينات والتي من اهمها فيتامين C وB (Alaee, 2018). تساهم العديد من المركبات في البطاطا في النشاط المضاد للأكسدة (Akrimi وآخرون 2020 و Suárezا وآخرون 2020 و Hellmann وآخرون 2021). تزرع البطاطا بمساحات واسعة في انحاء العالم وتحتل مرتبة مهمة في العراق من حيث المساحة المزروعة والانتاجية, فقد بلغ متوسط المساحة المزروعة في العراق حوالي 1.717800 دونم، تنتج حوالي 392348.0 طن سنويا خلال المدة من 2013-2018 (FAOSTAT, 2019).

تصاب البطاطا بالكثير من الامراض الفايروسية والفطرية والنيماطودية والبكتيرية, ويعد مرض التعفن الطري البكتيري Bacterial soft rot الذي تسببه البكتريا الممرضة *Pectobacterium carotovorum carotovorum* من اهم الامراض كون الاصابة تبدأ في الحقل وتتطور سريعا اثناء نقل وتخزين الدرنات (Youdkes وآخرون, 2020), لينتج عنها خسائر كبيرة في المحصول (Guttman وآخرون, 2021), فضلاً عن كونها يصيب عدداً من المحاصيل الاقتصادية الاخرى و نباتات الزينة في جميع انحاء العالم (Perombelon, 2002, De Boer, 2003, و Yishay وآخرون, 2008).

تعد السيطرة على الأمراض النباتية من الأهداف الرئيسية التي يجب الاهتمام بها للحفاظ على جودة ووفرة الغذاء والأعلاف والألياف التي ينتجها المزارعون والذين غالباً ما يعتمدون على المبيدات

الكيميائية في مكافحة هذه الامراض (Pal و Gardener, 2006 و Aboutorabi, 2018), إلا أن الأستعمال المفرط وغير الصحيح لهذه المبيدات صاحبه ظهور العديد من مشاكل لم تكن بالحسبان وذلك لما أحدثه من خلل بالتوازن البيئي مما أدى إلى سمية شديدة إلى عدد كبير من الطفيليات والمفترسات (الأعداء الحيوية) وإضعاف دورها في عملية المكافحة الطبيعية فضلا عن حصول تسمم للكائنات غير المستهدفة كالحوانات الأليفة والطيور والنحل والإنسان، كما أدى الاستعمال غير الصحيح لهذه المبيدات إلى ظهور صفة المقاومة للمبيدات (Fikadu, 2020 و Massi و اخرون, 2021) لذلك جرى التفكير في إيجاد واستعمال طرق بديلة مثل المقاومة الحيوية التي تشمل استعمال الكائنات الحية الدقيقة أو المنتجات لمكافحة مسببات الأمراض النباتية والتقليل من اضرارها وفي الوقت نفسه لا تسبب أضرار للبيئة ، وتعد بعض انواع البكتريا و الفطريات غير الممرضة للنبات من اكثر الكائنات المستعملة في هذا المجال (Tariq و اخرون 2020).

كما تحتل التطبيقات الزراعية الحديثة مثل التقنية النانوية مكانه مهمه وخصوصاً في مجال وقاية النبات من خلال تحضير مستحضرات ومبيدات نانوية يمكن ان تقدم الحلول في مكافحة الافات الزراعية فضلا عن طرائق للكشف عن متبقيات المبيدات وازالة اثارها السلبية وكذلك تحسين خواص عوامل المكافحة الاحيائية وغيرها من التطبيقات التي قد تساهم في تقليل التلوث البيئي وتخفيض كلف التطبيقات (Siddiqui وآخرون 2020).

يضاف الى ذلك تعتبر عملية التشخيص الدقيق المبكر للمسببات المرضية عملية مهمه تساهم وبشكل كبير في السيطرة على المرض بحيث يوجد هناك عدة طرق مستعملة لتشخيص المسببات المرضية البكتيرية وتعد الاختبارات الكيموحيوية والطرق الجزيئية المعتمدة على تفاعلات تسلسل البلمرة (Polymerase Chain Reaction (PCR)) من أهم الطرق المطبقة في تشخيص البكتريا الممرضة للنبات (Oulghazi وآخرون، 2021). ونظرا لأهمية مرض التعفن الطري على البطاطا و انتشاره الواسع في محافظتي كربلاء و بابل و لقله الدراسات حول هذا المرض في هاتين المحافظتين شملت الدراسة محاور هي :

- 1- عزل وتشخيص البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري البكتيري (من بعض حقول ومخازن واسواق محافظتي كربلاء و بابل) .
- 2- اختبار القدرة الامراضية للعزلات البكتيرية التي تم الحصول عليه .

- 3- اختبار حساسية بعض اصناف البطاطا المزروعة في محافظة كربلاء وبابل لمرض التعفن الطري كوسيلة مهمة من وسائل مقاومة المرض.
- 4- تقييم فعالية بعض عوامل المقاومة الاحيائية والمبيدات الكيميائية في مقاومة مسبب مرض التعفن الطري البكتيري مختبرياً .
- 5- تقييم فعالية تراكيز مختلفة من اوكسيد الزنك النانوي واوكسيد المغنيسيوم النانوي ضد مسبب مرض التعفن الطري مختبرياً.
- 6- تقييم فعالية عوامل المقاومة الاحيائية والمبيدات الكيميائية واوكسيد المغنيسيوم النانوي الأفضل في مكافحة مسبب مرض التعفن الطري البكتيري تحت ظروف البيت البلاستيكي .

**ثانياً :مراجعة المصادر Literature Review:****1.2. الأهمية الاقتصادية لمرض التعفن الطري :**

يعد مرض التعفن الطري من اهم الأمراض البكتيرية التي تصيب العديد من النباتات ومن ضمنها العائلة الباذنجانية بما في ذلك محصول البطاطا والعديد من المحاصيل الأخرى اذ يتواجد المرض في المناطق الأستوائية والمعتدلة وهو من الأمراض التي تصيب النباتات في الحقل واثناء التخزين مما يتسبب عنه خسائر كبيرة (Motyka وآخرون، 2021). يسبب مرض التعفن الطري العديد من الأنواع البكتيرية المهمة اقتصادياً ومن اهم هذه الانواع هي *P. carotovorum subsp. carotovorum* و *Erwinia chrysanthemi* و *P. carotovorum subsp. atroseptica* (Rahmanifar وآخرون، 2012 و Li و آخرون، 2019 و Voronina و آخرون، 2019). ويعتبر هذا المرض أحد أكثر العوامل المحددة لإنتاج الخضراوات وينتشر المرض في جميع انحاء العالم ويسبب فقداً كلياً للإنتاج اذا توافرت الظروف الملائمة له (Abd-El-Khair وآخرون، 2021).

ذكر Elphinstone (2005) ان مرض التعفن الطري من اهم الأمراض التي تصيب الفاكهة أيضاً اذ تصل الخسائر الى 60% ، وأشار Oulghazi وآخرون (2020) الى ان خسائر الانتاج الناجمة عن الاصابة بمرض التعفن الطري البكتيري المتسببة عن البكتريا *E. carotovorum* قد تصل الى مستويات عالية في مجموعة متنوعة من الانواع النباتية. وبرهن Ngadze وآخرون (2012) ان هناك خسائر تقدر بأكثر من 90% سجلت نتيجة لزراعة درنات بطاطا مصابة بمرض التعفن الطري وذكر Zaczek-Moczydłowska وآخرون (2019) ان الأنواع الأكثر شيوعاً والمسببة للتعفن الطري على الخضراوات في أيرلندا الشمالية هي *Pectobacterium atrosepticum* و *Pectobacterium* *carotovorum subsp. carotovorum*. وبين Meng وآخرون (2017) ان خلال المدة من 2014 إلى 2015 ، حدث تعفن بكتيري طري مدمر على سيقان وأوراق الخيار في مقاطعات شاندونغ وشانشي وخبني وخنان ولياونينغ في الصين ، مما أدى إلى خسائر اقتصادية جسيمة لإنتاج الخيار. و اشارت الدراسة التي قام بها Farrar وآخرون (2009) ان البطاطا في كاليفورنيا-مقاطعة كيرين تتأثر بشكل كبير بالبكتريا *E. carotovorum subsp. Carotovorum* حيث قدرت نسبة الخسائر بـ 30% من الحاصل و ذكروا ان الاصابة بهذه البكتريا اسفرت عن خسائر كبيرة للبطاطا بعد الحصاد في وادي San Joaquin. وذكر Tahir و آخرون (2017) ان مرض التعفن الطري المتسبب عن البكتريا *P. carotovorum carotovorum subsp.* تكمن خطورته في انه يسبب خسائر كبيرة للبطاطا بعد

الحصاد والخزن ويسبب إصابة متوسطة الى عالية في مناطق واسعة من باكستان تتراوح بين 2-7% .  
وَوَجَدَ Sahilah وآخرون (2008) ان البكتيريا *P. chrysanthemi* تصيب الاناناس وتصل الأضرار  
الى 40% تقريباً. وتم عزل *P. carotovorum subsp. carotovorum* من بعض الخضروات التي ظهرت عليها أعراض العفن الطري كدرنات بطاطا ،  
جذور البطاطا الحلوة ، ثمار الخيار ، جذور الجزر و ثمار الباذنجان (Mikhail وآخرون، 2019).

## 2.2. البكتيريا المسببة لمرض التعفن الطري :

وُصِفَ الجنس *Erwinia* لأول مرة من قبل Waldee (1945) ولكن هذا الجنس في حالة تصنيفية متغيرة باستمرار اذ صنف لاحقاً الى جنسين معروفين بالوقت الحاضر هما *Pectobacterium* و *Dickeya* (Skerman وآخرون، 1980) وعلى هذا الأساس فان الأنواع المعروفة حالياً وهي *Pectobacterium atrosepticum* و *Pectobacterium carotovorum subsp.* و *Erwinia carotovora subsp.* كانت تعرف سابقاً باسم *Dickeya spp.* و *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* و *Erwinia carotovora subsp. carotovora* و *Erwinia carotovora subsp. chrysanthemi* على التوالي (Portier وآخرون، 2019 و Li وآخرون، 2019) و *Erwinia carotovora subsp. atrosepticum* تحت النوع *Erwinia carotovora subsp. atrosepticum* (2019) وتم إعادة تسميتها الى *Pectobacterium atrosepticum* (Dees وآخرون، 2017 و Portier وآخرون، 2019). يعود جنس *Pectobacterium* الى عائلة Enterobacteriaceae (Dees وآخرون، 2017). وهي من اهم العوائل للمسببة للتعفن الطري في المحاصيل المهمة اقتصادياً مثل بطاطا والطماطة والذرة (Oulghazi وآخرون، 2021)، فضلاً عن ذلك تعد الأجناس *Pectobacterium* و *Dickeya* المسبب الرئيس لمرض الساق الأسود Black leg disease (Werra وآخرون، 2020)، و تكون مسببات الأمراض البكتيرية من جنس *Pectobacterium* تعفنًا طريًا في العديد من المحاصيل ، وتؤدي إلى خسائر اقتصادية كبيرة في جميع أنحاء العالم. (Fan وآخرون، 2020 و Koh وآخرون 2012). وهي قادرة على تدمير مكونات الأنسجة النباتية من خلال نشاط الإنزيمات المحللة لجدار الخلية النباتية ، (Lee وآخرون، 2013 و Li وآخرون، 2018 و Giovannoni وآخرون، 2020). أشار Paul وآخرون (2020) ان مرض التعفن الطري يحدث كنتيجة مباشرة لنشاط هذه الإنزيمات التي تفرزها هذه البكتيريا والتي تؤدي الى تحلل جدران الخلايا وتسمى هذه الإنزيمات المحللة للجدران التي تفرزها هذه البكتيريا (PCWDEs) plant cell wall-degrading enzymes مثل Pectinases و Cellulases

و Hemicellulases و Proteinases و لإحداث أعراض المرض ، تتطلب هذه البكتريا ظروفًا بيئية موأتية ، مثل الرطوبة ، وتوافر المغذيات التي يتم الوصول إليها من خلال فتحات النباتات الطبيعية أو الجروح، وبعد الدخول الى النبات فإنها تتواجد في المساحات بين الخلايا أو الأنسجة الوعائية ، حيث ينتج إنزيماتها التي تحلل جدار الخلية النباتية ( Collmer واخرون، 2009 و Paul وآخرون، 2020).

### 3.2. المدى العائلي للبكتريا المسببة لمرض التعفن الطري:

لبكتريا *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* مدى عائلي واسع اذ تصيب نباتات كثيرة مثل البطاطا، الجزر، الكرفس، الخيار، الموز، الطماطة، الفلفل، الفاصولياء ، اللهانة ، الكسافا ، القهوة ، الذرة ، القطن ، البصل ، البطاطا الحلوة (Toth واخرون، 2003 و Oztruk واخرون، 2018) و أشار Lee، (2021) الى ان الانواع *P. atrosepticum* ، *P. betavasculorum* ، *P. wasabiae* و *P. carotovorum subsp. odoriferum* لها مدى عائلي ضيق نسبياً بخلاف *P. carotovorum subsp. carotovorum* ذات المدى العائلي الواسع وذكر شريف (2012) ان بكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* تُهاجم الاجزاء الخازنة للمواد الغذائية كالدرنات والابصال والكورمات و الريزومات والسيقان العصارية للنباتات المختلفة . و اوضح Motyka-Pomagruk وآخرون(2021) ان اهم المحاصيل التي تصيبها البكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* هي محاصيل العائلة الباذنجانية كالتبغ والبطاطا والفلفل والباذنجان . و أوضح Li وآخرون ( 2020 ) ان النوع *P. carotovorum subsp. carotovorum* يصيب نبات الملفوف في الصين ويسبب خسائر كبيرة. كما بين Guttman وآخرون (2021) ان هذا النوع يهاجم نبات زنبق الكالا في العديد من الدول حول العالم مثل نيوزيلندا وهولندا والولايات المتحدة . ويعتبر هذا المرض أحد الأمراض المدمرة الرئيسة التي تؤثر على إنتاج الفلفل الحلو في الحقول التجارية في جنوب جورجيا في الولايات المتحدة الأمريكية (Hua واخرون، 2020). و وَجَدَ Gottsberger و Huss، (2016) ان البكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* تصيب نبات القرع في شرق النمسا وتسبب تعفن اللب الداخلي له . وبتوافر الظروف الجوية المؤاتية تصبح اضرارمرض التعفن الطري عالية جدا قد تصل إلى 67 ٪ من المحصول ، على وجه الخصوص على بطاطا والملفوف والخس والبصل والجزر في اوربا ( Oztruk واخرون، 2018).واشار Araujo وآخرون ( 2020 ) الى ان البكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* تصيب أشجار الكمثرى وتسبب خسائر في الإنتاج في البرازيل.

و تقسم البكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* على اساس الإختلافات في تفضيلها الغذائي واستطاعتها على التأقلم في بيئات جغرافية مختلفة (De Boer، 2003). وقد أدى الاختلاف في أحداث التعفن الطري و إستخدام التهجين و التصنيف العددي وتحليل السلالات و علم الامصال الى التعرف على العديد من التحت أنواع للبكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* (Nabhan وآخرون، 2012 و Maja وآخرون، 2019).

#### 4.2. تصنيف البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري :

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: *Pectobacterium*

Species: *carotovorum*

Subspecies: *carotovorum*

(Holt وآخرون، 1994 و Gardan وآخرون، 2003 و Czajkowski وآخرون، 2015 و Adeolu وآخرون، 2016 و Niemi وآخرون، 2017) .

#### 5.2. دورة مرض التعفن الطري :

تتنوع طرق إصابة النبات بالبكتريا *P. carotovorum* ، اذ يمكن ان تكون بالبذور الحاملة للبكتريا أو عن طريق التلقيح المباشر للجروح أو الفتحات الطبيعية ( الثغور أو العديسات في النباتات الناضجة) و اثناء عملية النقل والخرن ، وهو الأكثر شيوعاً ( Umunna وآخرون، 2016 و Haque وآخرون، 2017 و Zhangm وآخرون، 2020). تشتي البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري في أماكن متعددة مثل التربة والاجزاء النباتية المصابة وفي الحشرات ( Maisuria وآخرون، 2012 و Czajkowski وآخرون، 2015). و عند إصابة النبات وتكون الظروف مؤاتية تتغذى البكتريا فوراً على السوائل

الخلوية للخلايا المصابة وتبدأ في التكاثر وأثناء تكاثرها فإنها تطلق المزيد من الإنزيمات المحللة لجدران الخلايا النباتية (Kolomiets وآخرون، 2021). يؤدي الضغط المرتفع داخل الخلايا وزيادة الجهد الأوزموزي إلى انفجار الخلايا وموتها وبالتالي توفير المزيد من المواد المغذية للبكتيريا (Davidsson وآخرون 2013). يتطلب حدوث المرض في الحقل إلى رطوبة تقترب من 100% أو بوجود الماء الحر على سطوح الاجزاء الملوثة ببكتريا التعفن الطري (Kolomiets وآخرون، 2021 و Shu وآخرون 2021).

## 6.2. تشخيص البكتريا *P. carotovurum subsp. carotovorum* المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا:

### 1.6.2. التشخيص الكيموحيوي :

الاختبارات الكيموحيوي هي الاختبارات المستخدمة لتحديد أنواع البكتريا على أساس الاختلافات في الأنشطة الكيموحيوية للبكتيريا المختلفة (Schaad وآخرون، 2001). هذه الاختلافات بين نوع وآخر في التمثيل الغذائي ، وإنتاج بعض الإنزيمات ، والقدرة على استخدام مركب معين وما إلى ذلك تساعد على التعرف على الأنواع المختلفة من خلال هذا النوع من الاختبارات (Schaad وآخرون 2001 و Terta وآخرون، 2013 و Li وآخرون 2020). ان التشخيص القائم على الاختلافات المظهرية غير ممكن في حالة البكتريا ، لأن هذه الاختلافات ، لا يمكن ان تفرق نوعًا واحدًا من البكتريا عن الآخر فيما يتعلق بشكل وحجم وترتيب البكتريا لأن هناك العديد من أنواع البكتيرية ذات الشكل والحجم المتشابه لذلك في نهاية المطاف يستند تحديد البكتريا في الغالب على الاختلافات في أنشطتها الكيموحيوية (ztruk وآخرون، 2018). ذكر Terta وآخرون (2013) و Agyemang وآخرون (2020) بأنه كل نوع من البكتريا لديه مجموعة محددة من الأنشطة الأيضية المختلفة عن جميع الأنواع الأخرى. هذه البصمات البيوكيميائية هي خصائص تسيطر عليها الإنزيمات البكتيرية، ويمكن تصنيف الإنزيمات البكتيرية إلى فئتين هما الإنزيمات التي تعمل داخل الخلايا البكتريا وهي المسؤولة بشكل رئيس عن توليف المواد الجديدة protoplasmic وإنتاج الطاقة الخلوية من مواد بسيطة وهي ضرورية للبقاء الخلوي والوظيفي، وإنزيمات تعمل خارج الخلية هذه هي الإنزيمات التي تفرزها الخلايا البكتيرية إلى المناطق المحيطة لتحلل المواد المعقدة ذات الوزن الجزيئي العالي مثل البروتينات والسكريات والدهون ، والتي لا يمكن أن تتحلل غشاء الخلية البكتيرية ، بسبب حجمها الكبير (البروتينات والسكريات) أو بسبب طبيعتها المعقدة مثل (الدهون) (Kraepiel و Barny، 2016)، . أشار Hemraj وآخرون (2013) و Dadaşoğlu و Kotan (2017) ان هناك العديد من الاختبارات الكيموحيوية المستخدمة لتشخيص انواع

البكتريا ومنها: احمر المثيل (Methyl red) ، فوكس بروسكاور (Voges–Proskauer)، الكاتليز (Catalase) ، اختبار فنيل الانين ، واختبار قابلية ذوبان هيدروكسيد البوتاسيوم، تحلل النشا ( Starch hydrolysis) ، تمييع الجيلاتين (Gelatin liquefaction) ، الاوكسيديز (Oxidase) وغيرها من الاختبارات.

### 2.6.2. التشخيص الجزيئي للبكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum*:

يعد التشخيص الجزيئي للبكتريا من الطرق المستخدمة بشكل واسع في علم الاحياء الجزيئي ، اذ تعتمد على إنتخاب و تضخيم منطقة محددة من جينوم الكائن الحي و الكشف عن التغيرات أو التشابه في تسلسلات نواتج الحامض النووي (PCR-amplified products) (Frisvad و آخرون، 2016). اخترع تفاعل البوليميريز المتسلسل عام 1983 من قبل العالم الأمريكي Kary Mullis ( قازانجي و جبر، 2017 ) يُعد هذا التفاعل أساسًا للعديد من الفحوصات الجينية، وتتضمن تحليل عيناتٍ قديمةٍ من الدنا وتحديد العوامل المُسببة للعدوى واستخدام تفاعل البوليميريز المتسلسل ( Sarfraz و اخرون ، 2018 ) يتم تضخيم نُسخٍ من تسلسلات الحمض النووي في دوراتٍ من تغيرات درجة الحرارة ( Li و اخرون ، 2020 ) . تفاعل البوليميراز المتسلسل شائعًا حاليًا ولا غنى عنه في كثيرٍ من الأحيان حيثُ يستخدم في المختبرات الطبية والبحوث المختبرية السريرية في مجموعةٍ واسعةٍ من التطبيقات العملية والتي تتضمن البحوث الطبية الحيوية والطب الشرعي الجنائي و التحليل الوظيفي للجينات، وتشخيص ورصد الأمراض الوراثية، وتحليل البصمات الجينية مثلًا في علم الأدلة الجنائية واثبات النسب ، والكشف عن مسببات الأمراض في اختبارات الحمض النووي لتشخيص الأمراض المعدية (Kim وآخرون، 2021) . يستعمل الجين 16srRNA لتشخيص البكتريا لتواجد هذا الجين في جميع انواع البكتريا تقريباً (Janda و Abbott، 2007). استخدم Oskiera وآخرون ( 2017 ) تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل في تشخيص عزلات البكتريا *P. carotovorum subsp. Carotovorum* من خلال استهداف الجين 16srRNA واستخدم Slawiak وآخرون (2009) تقنية PCR في تشخيص البكتريا (syn. *Dickeya spp.* (*Erwinia chrysanthemi*) وقام بنشر اول بحث من نوعه عن التعفن الطري على البطاطا في بولندا وتمكن Czajkowski وآخرون (2015) من الكشف وتحديد وتمييز أنواع البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري باستخدام تقنية PCR.

## 7.2. طرق مكافحة لمرض التعفن الطري :

## 1.7.2. مكافحة الأحيائية:

نالت مكافحة الأحيائية اهتماماً متزايداً من قبل الباحثين في العقود الأخيرة كأحد بدائل المبيدات الكيميائية في مجال مكافحة أمراض النبات خاصة بعد الإدراك المتزايد لمخاطر المبيدات على البيئة بشكل عام وصحة الإنسان بشكل خاص وظهور صفة المقاومة للمبيدات في بعض مسببات الممرضة ( Eilenberg وآخرون، 2001 و Van Lenteren وآخرون، 2018). إذ اتجهت الأنظار نحو الحد من استخدام الكيمياء الزراعية في إدارة أمراض النبات (Agrios، 2005 و Thambugala وآخرون، 2020). وتتركز جهود كبيرة اليوم على البحث عن مبيدات آمنة وصديقة للبيئة وفعالة كبديل عن مبيدات الفطريات الكيميائية المصنعة لتقليل الخسائر والسيطرة على الأمراض النباتية التي تؤدي إلى خسائر اقتصادية (O'Brien، 2017). إذ تكتسب عوامل مكافحة الكيموحيوية لأمراض النبات مكانة كبديل قابلة للتطبيق لمبيدات الآفات نظراً لمستوى الأمان المتزايد الملحوظ والحد الأدنى من التأثيرات البيئية السلبية (Deketelaere وآخرون، 2017 و Gupta، 2018). من الضروري مواصلة هذا النوع من البحث، إذ أدى الاستخدام المكثف والعشوائي لمبيدات الفطريات الاصطناعية في حماية المحاصيل وحفظ الأغذية بعد الحصاد إلى مقاومة بعض مبيدات الفطريات وحدثت تأثيرات شديدة على البشر والحيوانات والحياة البرية مما أدى إلى آثار بيئية ضارة واسعة النطاق (Gupta، 2019)، أدى ذلك إلى إجراء أبحاث مكثفة حول استخدام الأحياء المجهرية المضادة كعوامل وقائية، ويمكن الآن السيطرة على العديد من الأمراض النباتية نتيجة لذلك، إذ تم استغلال المنتجات التجارية التي تحتوي على *Biological control agents in microorganism (BCAs)* الميكروبية بنجاح في الزراعة الحديثة على سبيل المثال، المنتجات القائمة على *Trichoderma* والمبيدات الحيوية القائمة على *Bacillus thuringiensis* (Mahfouz و Abd-Elgawad، 2020). ومع دخول تطبيقات علم الجينوم والهندسة الوراثية طورت هذه التقنيات بدرجة عالية من الدقة وتم تطبيقها لتحسين السلالات الفطرية لعمليات التصنيع الزراعي وإجريت العديد من الدراسات لتحديد السمات الوراثية لمضادات الفطريات وتحديد قدرتها على تعزيز نشاط مكافحة الحيوية (Droby، 2006 و O'Brien، 2017).

ويعد التضاد الحيوي من الظواهر المهمة التي تستعمل في المقاومة الحيوية لأمراض النبات، فهي تسبب تثبيط نمو الكائن الممرض أو تقضي عليه كلياً أو أنها توقف انبات وحداته التكاثرية، إذ تعتمد هذه الظاهرة على مقدرة إحدى الكائنات الدقيقة المضادة (الكائن المقاوم) على إنتاج مضادات حيوية تتكون من

مواد سامة هي نواتج ثانوية (Secondary Metabolites)، تؤثر تأثيراً ضاراً على واحد أو أكثر من الكائنات الأخرى (Köhl وآخرون، 2019).

وتعد الكائنات الحية الدقيقة الفعالة و المفيدة ادوات مهمة للمقاومة الحيوية لمرض التعفن الطري Soft Rot ومن هذه الكائنات انواع من البكتريا *Bacillus* و *Azotobacter* و *Pseudomonas* وغيرها من سلالات البكتريا الأخرى غير الممرضة والتي استخدمت كعوامل مقاومة حيوية ضد مسببات امراض التعفن الطري ( Essarts وآخرون، 2021، و Mekonnen و Kibret، 2021). فقد أدى استخدام البكتريا المحيطة بالجذور والتي تعمل كمحفزات لنمو النبات Plant Growth promoting (Rhizobacteria (PGPR) وكذلك البكتريا المتعايشة داخلياً مع النبات (Endophytes) الى السيطرة على مرض التعفن الطري البكتيري في العديد من المحاصيل (Lee وآخرون، 2021، و Abd-El-Khair وآخرون، 2021).

### 1.1.7.2 : *Trichoderma harzianum*

تعد انواع الفطر *Trichoderma* من أكثر عوامل مكافحة الاحيائية نشاطا ضد المسببات الممرضة للنبات و خاصة السلالات التي تمتلك قابلية كبيرة للسيطرة على مدى واسع من المسببات الممرضة للنبات تحت ظروف بيئية مختلفة (Zin و Badaluddin، 2020). كما انه فطر واسع الانتشار في مختلف انواع الترب وعلى البقايا النباتية و يعود ذلك لامتلاكه فعاليات أيضية مختلفة ولقدرته التنافسية العالية و يتميز الفطر بسهولة عزله وسرعة نموه على الاوساط الزراعية (Ali Khan وآخرون، 2020). ويتميز فطر *T. harzianum* قدرة عالية على التأقلم مع مختلف الظروف المناخية، اذ يوجد بكثرة في الطبيعة وفي التربة نتيجة لنموه السريع وقدرته على استعمال مختلف المواد الغذائية (Siddaiah وآخرون، 2017 و Xue وآخرون، 2017). بينت بعض الدراسات أن *T. harzianum* من اكثر الفطريات تعدداً في التربة ويأتي بالمرتبة الثالثة بعد *Aspergillus* و *Penicillium* اذ يمثل وجود *T. harzianum* في الوسط الترابي ما يقارب 6 % من العدد الكمي للأجناس الفطرية (Poveda وآخرون 2019). يمتاز الفطر *T. harzianum* بسرعة نموه العالية وقدرته التكاثرية الكبيرة والتي تمكنه من التنافس والتغلب على الفطريات الممرضة في اشغال الحيز البيئي المحيط بجذور النباتات وبالتالي توفير الحماية لها من الإصابة بمسببات امراض النبات القاطنة في التربة وهذا بدوره سوف ينعكس إيجاباً على حيوية النباتات (Vinale وآخرون، 2008). إن نمو الفطر في المنطقة المحيطة بجذور النبات (Rhizosphere) يحفز على زيادة امتصاص الماء و بعض العناصر الغذائية من محلول التربة، ويزيد من دفاعاتها ضد الأضرار الحيوية والغير حيوية (Kumar وآخرون، 2019)،

اذ يستخدم *T. harzianum* لأغراض مختلفة في إنتاج المحاصيل الزراعية فهو يتفاعل مع الكائنات الحية الدقيقة الأخرى ، ولكن بشكل رئيس مع الفطريات المسببة لأمراض النبات (Druzhinina وآخرون، 2006 و 2006 و Harman و Abd-El-Khair وآخرون، 2021) ، تتضمن هذه التفاعلات التطفل المفرط والمنافسة والتضاد (Benítez وآخرون، 2004 و Błaszczyk وآخرون، 2014 و Poveda وآخرون 2019)، فعند اضافته للتربة لا يوفر للنبات مقاومة للأمراض الفطرية المختلفة فحسب بل أدى أيضاً إلى تحسين نمو النبات وجودة الثمار وزيادة عددها (Molla وآخرون، 2012 و 2017، Khan و Fiorentino وآخرون، 2018).

اشارت الدراسات أيضاً أن الفطر *T. harzianum* ينتج خليطاً غنياً من الإنزيمات والمضادة الحيوية والتي منها Peptaibols ، Trichodermin ، Trichorzianines ، Acetaldehyde ، Alamethicine ، Dermadine ، Alkylpyrones ، chitinases و  $\beta$ -1,3- glucanases ، اذ تعمل هذه المركبات على تحليل أو منع تطور الخيط الفطري للمسبب المرضي المنافس وتثبيط إنتاج الابواغ وتحريرها (شمران، 2017). كما يمتلك الفطر *T. harzianum* عدد من الجينات التي لها دور في تحطيم الجدار الخلوي للمسببات الممرضة مثل Tri5 Gene المسؤول عن انتاج Trichothecene الذي يثبط انتاج DNA و البروتين في خلايا المسببات الممرضة والذي يؤدي الى تثبيط نموها ، وكذلك الجين الذي يثبط انتاج انزيم Cellulase و Xylanase في جدار الخلية للمسببات الممرضة ، والجين المسؤول عن انتاج انزيم Serine Protease و هو من اهم عوامل نجاح الفطر *T. harzianum* في مكافحة الاحيائية (Aissaoui وآخرون 2016 و Mironenka وآخرون، 2020). يستخدم *T. harzianum* أيضاً على نطاق واسع كسماد حيوي لجميع المحاصيل تقريباً مع أو بدون اضافات (Debnath وآخرون، 2020). فعند اضافته الى مجموعة من الخضر أدى الى زيادة في إنتاجها وكان أكثر فاعلية في الطماطة (Molla وآخرون، 2012 و Illescas وآخرون، 2020). كما تم تسجيل استجابة إيجابية من محاصيل أخرى مثل الفول السوداني ، القطن ، القمح ، التبغ ، قصب السكر ، الباذنجان ، الموز ، الطماطة ، البنجر ، الفلفل الحار ، البطاطا، فول الصويا ، الحمضيات ، القرنبيط ، البصل ، البازلاء وزهرة الشمس (Kamal، 2018). كما ان له دور الفطر *T. harzianum* هو تحسين غلة المحاصيل ويتحقق هذا الهدف بشكل أساسي من خلال القدرة على تحلل المركبات العضوية المعقدة الموجودة في التربة وايصالها للنباتات بشكل أبسط بحيث يمكن امتصاصها (Khan وآخرون، 2017 و Debnath وآخرون، 2020)، لذلك يمكن تقليل متطلبات النبات من السماد الكيميائي عن طريق إضافته للتربة بدلاً من الأسمدة الصناعية (Khan وآخرون، 2017 و Mahato وآخرون، 2018). بعض

عزلات الفطر *T. harzianum* تعمل على تعزيز نمو النبات عن طريق افرازها لمنظمات نمو نباتية مثل هرمون الاثلين الذي يسرع انبات البذور ويعزز نمو بادراتها نتيجة للعلاقة التكافلية بين الفطر والمجموع الجذري وزيادة قابلية النباتات على مقاومة الظروف غير الملائمة سواء كانت بيئية مثل الجفاف أو حيوية مثل المسببات المرضية (Alizadeh وآخرون، 2020). ووضح Ghoniem وآخرون (2021) و Maruyama وآخرون (2020) ان الفطر *T.harzianum* قد تثبط نمو الفطر *Pythium ultimum* و *Sclerotinia sclerotiorum* وبنسب عالية في اختبار التضاد . اشار Hirpara وآخرون (2019) الى امكانية تثبيط المسببات الممرضة باستعمال سلالة من الفطر *T.harzianum* منتجة للأنزيم Chitinase و 3-β-glucanase بمستويات عالية. وذكر Jones و Stewart (2000) تم عزل الفطر *T.harzianum* من حقول الخضراوات و من تربة حاوية على عدد من المسببات المرضية في نيوزلندا ، حيث تمكن الفطر *T.harzianum* من اختزال حيوية الوحدات التكاثرية لهذه المسببات بعد اربعة اسابيع من الحضان ، و اوضح Sridharan وآخرون (2021) اهمية المركبات الايضية التي ينتجها الفطر *T.harzianum* في تثبيط النمو الشعاعي لعدد من الفطريات الممرضة مثل *Sclerotium rolfsii* و *Heterodera oryzae* و *Alternaria alternata* ، كما ذكر Ahmad وآخرون (2021) ان الفطر *T. harzianum* تثبط نمو غزل الفطر *Ascochyta rabiei* الذي يصيب الحمص بعد سبعة ايام من اجراء اختبار التضاد . و وجد Abd-El-Khair وآخرون (2021) ان *T.harzianum* اظهر كفاءة عالية في مقاومة البكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا مختبريا وحقليا. و وجد الأسدي (2020) ان استخدام خليط من عدة أنواع من الـ *Trichoderma* و هي *T. longibrachaitum* ، *T. longibrachaitum* ، *T. asperelloides* ، *T. asperelloides* ، *asperellum* أدى الى تثبيط كبير في مرض تعفن البذور و موت بادرات الطماطة المتسبب عن الفطر *Solanum lycopersicom L* في الأصص البلاستيكية وازدادت نسبة التثبيط بزيادة عدد أنواع *Trichoderma* المستخدمة في الخليط.

### 2.1.7.2 البكتريا الجذرية المحفزة للنمو النباتي Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR):

تعد هذه البكتريا من الأحياء المجهرية النافعة والمفيدة للنبات اذ تتواجد بشكل حر في التربة تعزز النمو وتوفر الحماية للنبات و يطلق عليها البكتريا الجذرية المعززة لنمو النبات (PGPR) ، وهي توفير الحماية للنبات ضد عوامل الإجهاد المتعددة (Timmusk وآخرون، 2018 و Sessitsch، 2019). اما

عن طريق تثبيت النيتروجين واذابة الفسفور وتجهيزها للنبات لتسهيل امتصاصها ونتاجها المركبات العضوية المتطايرة ومنظمات النمو النباتية ، او عن طريق تقليل تأثير بعض الأنزيمات والمركبات التي تنتجها مسببات المرض للنبات مثل الانزيمات المحللة للجدران مثل Lipases، Glucanase، Amylases، Chitinase، Proteases، وتعمل على تحفيز المقاومة المستحثة Induced Systemic Resistance (ISR)، مما يؤدي الى زيادة مقاومة النبات ضد الامراض وقد تبين ان البكتريا التي تنتمي الى الاجناس *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Xanthomonas*، *Rhizobium* و *Streptomyces* لها القدرة على تحفيز المقاومة المستحثة (Sharma وآخرون، 2018). وظهرت الدراسات أن سلالات البكتريا الجذرية *Rhizobacteria spp.* قادرة على زيادة كفاءة استخدام المغذيات والتخفيف من آثار الإجهاد المائي في المحاصيل ذات الطلب المرتفع على المياه ولديها تطبيقات محتملة لمواكبة الإنتاجية في سيناريوهات الإجهاد المائي (Pereira وآخرون، 2020). و تتواصل جذور النباتات مع الأحياء المجهرية بطريقة متطورة عن طريق الاتصال الكيميائي داخل منطقة الجذر، ويؤدي ذلك الى تحفيز الدفاعات او المقاومة المستحثة في العائل النباتي، وتؤدي الاتصالات الكيميائية الى تحفيز استحثاث الدفاعات في النبات (Basu وآخرون، 2021). وتنتج البكتريا الجذرية المحفزة للنمو النباتي المركبات العضوية المتطايرة (Volatile organic compounds) والتي تساعد بشكل كبير في تحسين نمو النبات وتحفيز المقاومة الجهازية ISR، وتثبيط نمو مسببات المرضية وهي قادرة على الانتشار في التربة مما يعطي هذه المركبات ميزة العمل من بعد (Gupta وآخرون، 2019 و Kong وآخرون، 2021). ومن البكتريا الجذرية المحفزة للنمو النباتي PGPR المستعملة في هذه الدراسة هي البكتريا *Azotobacter chroococcum*

#### 1.2.1.7.2 دور البكتريا *Azotobacter chroococcum* في المقاومة الحيوية لمسببات امراض النبات:

تتواجد البكتريا *A. chroococcum* في منطقة نطاق الخذور (Rhizosphere) على اسطح جذور النباتات وقسم منها يدخل في النظام الجذري للنباتات مكون علاقة تعايشية معها وقسم آخر يعيش بصورة حرة في منطقة الرايبوسفير (Jensen وآخرون، 2021). ويعد اول تسجيل لجنس *Azotobacter* في عام 1901 من قبل عالم الأحياء الدقيقة وعالم النبات الهولندي ومؤسس علم الأحياء الدقيقة البيئية Beijerinck كأول مثبت نيتروجين هوائي يعيش بصورة حرة ،وهي بكتريا سالبة لصبغة كرام، هوائية اجبارية ، حرة المعيشة ، متباينة التغذية مصدر الطاقة لها تحليل المواد العضوية كمصدر للكربون والطاقة وهي صفة مهمة مميزة لها إذ أن لها قدرة على الاعتماد على مصادر

كاربوهيدراتية عدة (Khosravi و Dolatabad، 2020). الظروف المثلى لنموها وتطورها هي عند درجة حرارة 28-31 م° و pH 6.5-7.5 (Mahdi و اخرون، 2018 و Jensen و اخرون، 2021). خلاياها كبيرة، قطرها 2  $\mu\text{m}$  وطولها 5 - 10  $\mu\text{m}$  ، متعددة الاشكال ففي المزارع القديمة فقد تكون عصوية قصيرة أو بيضوية، بهيئة سلاسل أو تجمعات ، ولا تكون ابواغ لكنها تكون حويصلات أو كبسولة أو غلاف خارجي سميك يدعى Slime وعند توفر الظروف المؤاتية تثبت الكبسولة وتعطي خلايا خضرية ( Mahdi و اخرون، 2018). يعد النوع *A. chroococcum* من أكثر الأنواع التابعة للجنس *Azotobacter* انتشاراً في الترب العراقية (Khidher و Khider، 2011) .

يعود التأثير النافع لهذه البكتريا إلى إنتاجها للمضادات الحيوية ، و منظمات النمو وهي مواد ذات تأثيرات محفزة أو مثبطة لعمليات فسلجية كيموحيوية معينة في النبات والكاننات الحية الدقيقة مثل Gibberellins، cytokinins و auxins مما يعكس على تحسين بيئة نمو الجذور، كما اثبتت قدرتها على تحسين نمو النبات ونسجة التربة (Khosravi و اخرون 2020) وتقوم هذه البكتريا بأسغلال النيتروجين في الغلاف الجوي لتخليق البروتين الخلوي الذي يتم تثبيته في التربة ( Ferreira و اخرون، 2019 و Khosravi و Dolatabad، 2020 ) ، أظهرت الأبحاث التي أجريت على *A. chroococcum* في إنتاج المحاصيل أهميتها في تحسين تغذية النبات وتزيد من تحمل النبات للجهودات الحيوية وغير الحيوية وتحسين خصوبة التربة (Aasfar و آخرون، 2021) . كذلك تعد *A. chroococcum* من الأحياء الدقيقة المنتجة لمثبطات الأمراض النباتية عن طريق افراز انزيمات خاصة مضادة للمسببات المرضية مثل الفطريات، والبكتريا مما يوفر حماية للنبات من المسببات المرضية مثل انزيم ACC deaminase الذي ينظم عمل منظمات النمو ومنها الانزيمات المحللة لجدران خلايا المسببات الممرضة للنبات والحاوية على الكايتين مثل Endochitinase و Chitobiosidase (Kurrey و آخرون ، 2018 و Pandey و اخرون، 2019 و Aasfar و آخرون 2021) ، وتكوين مركبات Siderophores وهي مواد ذات وزن جزيئي واطيء تنتجها الخلية البكتيرية تحت ظروف نقص عنصر الحديد في التربة أو الوسط الزراعي (Aruna و Colombowala، 2020). فضلاً عن تعزيز توفير بعض المعادن مثل الكبريت، والحديد، والنحاس (Saharan و آخرون، 2011) . وقد اثبتت دراسات عدة نجاح استعمال البكتريا *A. chroococcum* في المكافحة الحيوية للمسببات المرضية اذ ذكر Akram و آخرون ( 2016) أن سلالة من *A. chroococcum* عزلت من جذور القمح أظهرت نشاطاً مضاداً قوياً ضد فطريات تعفن الجذور *Macrophomina phaseolina* و *Fusarium oxysporum*، وتم استخدام احد أنواع البكتريا *Azotobacter spp.* كعامل حيوي ضد مسببات

مرضة للنبات منها *Alternaria* و *Fusarium* و *Rhizoctonia* و *Macrophomina* و *Curvularia* و *Helminthosporium* و *Aspergillus* (Jnawali وآخرون، 2015). كما أظهرت بكتيريا *A. chroococcum* نسبة تثبيط عالية لنمو الفطر الممرض *R. solani*، وأثرت بشكل إيجابي في نسب إنبات بذور الحنطة فضلاً عن زيادة الكتلة الحيوية وطول المجموع الخضري من خلال التأثير في الفطر الممرض عند اختبارها في تجارب الأرصص واستنتج بأنه يمكن استعمالها كعامل مكافحة إحيائية لتثبيط مسبب مرض تعفن الجذور وفي زيادة نمو النبات (Fatima وآخرون، 2009).

## 2.7.2 المكافحة باستخدام تقنية النانو:

تعد تقنية النانو واحدة من أبرز اتجاهات وأولويات البحث العلمي والتي لها تأثير عميق على عدد كبير من الموضوعات بما في ذلك العلوم والهندسة والطب والزراعة (Kumar و Kalita، 2017). إذ يمكن أن تتفاعل المواد النانوية مع الأهداف الجزيئية الحيوية بطريقة أكثر فاعلية نظراً لصغر أحجامها ومعدلات انتشارها السريعة، وتكون أبعادها بين (1-100 nm) النانو هو واحد من المليار من المتر والنانو كلمة يونانية الأصل تعني قزم (Dwarf) بمعنى آخر جزءاً من مليار =  $10^{-9}$  (Nienhaus وآخرون، 2020). تتضمن تقنية النانومعالجة وإيجاد جزيئات دقيقة ذات المواصفات النوعية الفيزيائية المختلفة التي تميز الجسيمات النانوية عن المواد الأكبر حجماً (Mukhopadhyay، 2014). تشمل هذه التقنية بناء وإعادة هيكلة المواد من الخصائص الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية على مستوى النانو أي على نطاق الذرات والجزيئات، برزت تقنية النانوية بتأثيرها الكبير في القرن الحادي والعشرين على الاقتصاد العالمي ومفاصل الحياة بصورة عامة، ولكن بدايات البحث والتجربة في هذا المجال بدأت تنمو منذ ما يقارب من نصف قرن (Ahmed وآخرون، 2017).

يعد الحد من الأمراض النباتية من أهم التحديات في إنتاج المحاصيل حالياً وتؤثر التطورات السريعة في العلوم النانوية تأثيراً كبيراً على الممارسات الزراعية، إذ دخلت بعض المواد النانوية حيز السيطرة على الأمراض النباتية، وبطريقة لا تترك آثار ضارة على المحاصيل و أمانة للبيئة (Singh وآخرون، 2021). يمكن تحضير المواد النانوية في العديد من الأشكال المختلفة التي تتراوح من الجسيمات الكروية، والمكعبات، والقضبان إلى البنى ثلاثية الأبعاد الأكثر تعقيداً، والتي يمكن أن تخضع لتحول الشكل أو التكتل الذي يغير خصائصها الكيميائية أو الفيزيائية استجابةً لمختلف المحفزات الخارجية (Mabrouk وآخرون، 2021). تم تطوير مجموعة واسعة من المنصات أو المستشعرات ذات البنية الدقيقة أو النانوية ودمجها في صندوق أدوات التشخيص الجزيئي القياسي الذي يوفر حساسية استثنائية ودقة زمانية مكانية (Li و Bahrulolom وآخرون، 2021)، أيضاً استعملت في مجال أجهزة الاستشعار الحيوية

الزراعية الذي أخذ في الظهور في السنوات القليلة الماضية (Brun وآخرون، 2021) نظرًا لفعاليتها من حيث التكلفة وقابليتها للنقل الميداني، فقد أظهرت أجهزة الاستشعار النانوية بالفعل إمكانات واعدة للكشف الدقيق عن مسببات الأمراض التي تسبب عدوى شديدة لمختلف المحاصيل والنباتات المهمة اقتصاديًا (Kumar و Arora وآخرون، 2020). وَجَدَت تقنية النانو حديثاً أيضاً مجموعة واسعة من التطبيقات في الزراعة وصناعة الأغذية (Zhang وآخرون، 2019)، ومن المواد النانوية المستخدمة في السيطرة على الأمراض هو MgONPs و ان الالية المضادة للكائنات الدقيقة تتسبب عن الحجم النانوي الصغير و البنية الهيكلية و مساحته السطحية العالية (Linklater وآخرون، 2021). إذ يتم تكوين أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS مثل الأنيون  $O_2^-$  التي عند تحريرها من سطح الجسيمات النانوية NPs تسبب تدهور بنية غشاء الخلية و موتها بسبب الارتباط مع غشاء الخلية، وقد وجد ان المساحة السطحية لأوكسيد المغنيسيوم النانوي تؤدي الى زيادة تركيز  $O_2^-$  كلما صغر حجم الجسيمة وبالتالي تدمير اكثر فعالية لجدار الخلية (Yu وآخرون، 2020). و عند معاملة النباتات MgONPs لوحظ تولد سريع لأنواع الأوكسجين التفاعلية ROS مثل الأيون الفائق  $O_2^-$  في جذور النباتات المعاملة أوكسيد المغنيسيوم النانوي مما يشير الى انه قد يكون ناجم عن تفاعل أوكسيد المغنيسيوم النانوي مع المركبات الفينولية الموجودة بالجذور وهذه النتيجة تشير الى ان أوكسيد المغنيسيوم النانوي يحفز المقاومة المستحثة (ISR) (Imada وآخرون 2016 و Yao وآخرون، 2020)

واكتسبت مبيدات النانو البوليمرية الكثير من الاهتمام لأنها مرنة في التصميم وقابلة للتحلل ومتوافقة حيويًا، إذ يمكن أن تكون التركيبات النانوية القائمة على البوليمر مثل النانو أو الأغلفة النانوية أو الألياف النانوية بديلاً أفضل من المبيدات الكيميائية التقليدية (Nuruzzaman وآخرون، 2016 و Singh وآخرون، 2021). إذ تعمل المبيدات التقليدية على الحد من مسببات المرض للنبات ولكنها، من ناحية أخرى، تؤذي الكائنات الحية غير المستهدفة وتسبب عدم توازن في التنوع البيولوجي. (Patel وآخرون، 2014 و Köhl وآخرون، 2019). و أشارت الدراسات إلى أن MgONPs يحفز المقاومة الجهازية ضد البكتريا *Ralstonia solanacearum* عن طريق تنشيط مسارات إشارات حامض الساليسيليك (-SA) وحمض الياسمين (-JA) والإيثيلين (-ET) في نباتات الطماطة إذ تسلط هذه الحقائق الضوء على إمكانية استخدام MgONPs كبديل فعال لمبيدات الآفات الكيميائية في حماية المحاصيل (Imada وآخرون، 2016). وأظهرت الدراسات في المختبر أنه يمكن استخدام أوكسيد المغنيسيوم النانوي كمبيد ميكروبي ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام (Liao وآخرون، 2019). ومسببات الأمراض الفطرية (Parizi وآخرون، 2014). على عكس الكيماويات الزراعية، فإن آليات

السمية هذه على الأرجح بسبب التعطيل الفيزيائي والكيميائي المباشر أثناء التفاعل ، من خلال إفراز الأحماض الأمينية وحمض المالك maleic acid (Zhao وآخرون ، 2018). وبين El-Argawy وآخرون (2017) كفاءة MgO NPs و TiO<sub>2</sub> NPs و ZnO NPs في السيطرة على مرض تعفن جذور البنجر السكري ، إذ أظهرت نتائج المختبر أعلى تثبيط للنمو القطري عند استعمال MgO NPs بنسبة تثبيط 55.71% ، 62.22% و 77% وبالنسبة لجسيمات TiO<sub>2</sub> NPs و ZnO NPs كانت مقارنة بنسبة التثبيط. وَجَدَ الخفاجي (2020) تفوق جسيمات أكسيد الزنك النانوي و أكسيد المغنيسيوم في السيطرة على مرض التدرن التاجي المتسبب عن البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* على اليوكالبتوس و بإستخدام التراكيز (1.25، 2.50، 5.0 ) غم مختبريا على الوسط الزراعي و في البيت البلاستيكي .

### 3.7.2 المكافحة الكيميائية للبكتريا المسببة لأمراض النبات:

تعد المكافحة الكيميائية (Chemical control) بواسطة المبيدات الوسيلة الأكثر استخداماً في العالم على الرغم من الأضرار التي تسببها للبيئة والكائنات الحية غير المستهدفة و ذلك لكونها سهلة التطبيق و تعطي نتائج واضحة و سريعة و يمكن تطبيقها في مختلف البيئات (Panth وآخرون، 2020). ففي الولايات المتحدة الاميركية شكلت المكافحة الكيميائية نسبة 70% من طرائق المكافحة الاخرى المستخدمة في مكافحة مسببات المرضية الفطرية (Nesmith، 2001). و يُقصد بالمكافحة الكيميائية استخدام مجموعة المواد الكيميائية التي تعمل على قتل الآفات او تثبيط نموها أو منعها من التكاثر بما يؤدي في النهاية إلى خفض أعدادها (Fredricks وآخرون، 2019). استخدم خليط الجير والنحاس (لا يزال يُعرف باسم "مزيج بوردو) منذ وقت طويل في مكافحة الامراض النباتية المتسببة عن البكتريا ولا زالت المركبات والمبيدات التي يكون النحاس عنصر اساسي في تركيبها تستخدم كمبيدات للعديد من مسببات واهما البكتريا (Krofta وآخرون، 2012). يشمل نشاط مركبات النحاس العديد من الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض النباتية ، مما يجعل هذا العنصر أحد المكونات الرئيسية من تركيبات مبيدات الفطريات والبكتريا وغيرها من مسببات الممرضة للنبات في جميع أنحاء العالم (Lamichhane وآخرون، 2018) .

بينما يستمر النحاس في لعب أدوار رئيسة في الإدارة المتكاملة للآفات ، فهو ضروري للزراعة العضوية ، كون إدارة الأمراض في هذا النظام تعتمد كثيراً على استخدامه (Giri وآخرون، 2020) . ذكر Edwards (2008) أن مبيدات الآفات قدمت فوائد كبيرة مقارنة بطرق المكافحة الأخرى. وأشار Jiang وآخرون ، (2021) أن استخدام المبيدات في الحقل أدى إلى خفض شدة الإصابة بمرض التعفن الطري بنسبة 20% من متوسط جميع العزلات مقارنة مع المعاملة المصابة والتي وصلت إلى 80% من جميع العزلات. يعد

المبيد الكيميائي Beltanol من المبيدات الجهازية العائدة لمجموعة الكواينولين (Quinoline) و اسمة الشائع Hydroxyquinolin Sulfate، وَجَدَ الجنابي (2001 و2008) إن لمبيد Beltanol تأثير تثبيطي لنمو البكتريا *Ralstonia solanacearum* المسببة لمرض الذبول البكتيري الجنوبي على الطماطة، والبكتريا *Pseudomonas syringae phaseolicola* المسببة لمرض اللفحة الهالية على الفاصوليا وبنسبة تثبيط عالية مختبرياً وحقلياً ولم تختلف معنوياً عن معاملة المقارنة السليمة.

يكون Beltanol مركبات مخليبية متحدة مع عنصر النحاس ليسهل عملية دخوله الى خلايا الممرض ثم يتحرر لتدمير خلايا المسبب الممرض (Meister واخرون، 2002). وَجَدَ الخفاجي (2020) ان استخدام مبيد Beltanol بتركيز 1 مل /لتر ثبت نمو البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* المسببة لمرض التدرن التاجي على شتلات اليوكالبتوس في الوسط الغذائي NA وبنسبة 100% وانخفضت هذه النسبة عند استخدامه في الاصح البلاستيكية في البيت البلاستيكي ولكنه خفض عدد العقد وحجمها وبشكل معنوي قياسا بمعاملة المقارنة المصابة.

## ثالثاً : المواد وطرائق العمل :Materials and Methods

1.3. الأجهزة المستخدمة في الدراسة:

جدول 1. الاجهزة المستخدمة في الدراسة

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة	بلد المنشأ
.1	جهاز التعقيم البخاري (Autoclave)	LabTech	South korea
.2	الحاضنة (Incubator)	Memmert	Germany
.3	ميزان حساس (Analytical balance)	Denver Instrument	USA
.4	اطباق بتري (Petri-Dishes)	Guangzhou A&J Automatinon Equipment	China
.5	ثلاجة (Refrigerator)	Concord	Lebanon
.6	دوارق زجاجية مختلفة الاحجام (Flasks)	Unisonic LTD	Chine
.7	مجهر ضوئي مركب (Compound light Microscope)	Olympus	Japan
.8	انابيب اختبار (Test tubes)	Sigma	Germany
.9	محقنة طبية (Medical Syringe)	-	England
.10	شرائح زجاجية و اغطيتها (Slides and cover slide)	Whatman 4	England
.11	اوراق ترشيح دقيقة (Filter Papers)	Whatman	England
.12	فرن كهربائي (oven)	Memmert	Germany
.13	غرفة العزل (Laminar flow hood)	Lab Tech	South korea
.14	ماصات دقيقة (Micropipetes)	Gilson	Germany
.15	طاحونة كهربائية	Mammanlex	China
.16	جهاز التقطير	G.F.L	Germany
.17	ثاقب فليني (Cork Borer)	MiniScience	USA
.18	SPAD 502 Plus Chlorophyll Meter	Spectrum Technologies	England
.19	جهاز هزاز (Vortex)	Heidolph	Germany
.20	جهاز المطياف الضوئي (spectrophotometer)	Biotech Engineering	UK
.21	جهاز تسخين (Hot plate)	Photox	England
.22	جهاز قياس درجة pH (pH-meter)	Shanghai Puchun Measure Instrument	China
.23	جهاز طرد مركزي مبرد (Colling Centrifuge)	Labortechnik	Germany
.24	جهاز قياس الحرارة والرطوبة (Thermohyrometer)	-	China
.25	حمام مائي	Gallen hamp	England
.26	جهاز الترحيل الكهربائي (Gel Electrophoresis apparatus)	Encyclopaedia Britannica	UK
.27	جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل (Thermal cycler) و ملحقاته	MWG Biotch	Germany

## 2.3 . جمع العينات :

جمعت عينات درنات البطاطا التي تظهر عليها اعراض التعفن الطري من مخازن البطاطا والاسواق المحلية، كما جمعت عينات اخرى شملت درنات ، و السيقان المصابة بنفس الأعراض من الحقول المزروعة بالبطاطا خلال الموسم الخريفي 2020، اخذت العينات من عدة مناطق في محافظتي كربلاء وبابل كما موضح في جدول (2).

## جدول 2. المناطق التي جمعت منها عينات البطاطا المصابة بمرض التعفن الطري

المحافظة	منطقة الجمع	نوع المنطقة	نوع العينة
كربلاء	طويريج	سوق	درنات
	الحسينية	حقل	درنات
	الحر	سوق	درنات
	عين التمر	حقل	درنات
	الجدول الغربي	سوق	درنات
	الرجيبة	سوق	درنات
	الفيادة	حقل	درنات وسيقان
	البوكريدة	حقل	درنات وسيقان
بابل	الحلة	سوق	درنات
	المسيب	سوق	درنات
	ابي غرق	حقل	سيقان ودرنات
	القاسم	سوق	درنات
	الهاشمية	حقل	درنات
	الشوملي	سوق	سيقان ودرنات
	النيل	سوق	درنات

وضعت العينات في اكياس بولي أثلين وجلبت الى مختبر الدراسات العليا في قسم وقاية النبات /كلية الزراعة /جامعة كربلاء ، وأجريت عليها عمليات عزل وتنقية المسبب الممرض.

## 3.3 . عزل وتنقية المسبب المرضي :

أتبعت طريقة Doolobeldieva وآخرون ( 2016 ) في عزل المسبب المرضي مع تعديلات طفيفة اذ اختيرت درنات البطاطا التي ظهرت عليها اعراض الاصابة بمرض التعفن الطري والتي جلبت من المناطق المذكورة في الجدول (2) الفقرة 2-3 وغسلت بماء الحنفية الجاري للتخلص من الأتربة ، ثم عقت سطحيا باستخدام هايبيوكلورات الصوديوم (NaOCl) (الكور 5 %) تركيز 2% لمدة 3دقائق و

بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم 3 مرات للتخلص من المادة المعقمة ، وهرست بواسطة الهاون الخزفي بعد إزالة القشرة الخارجية للبطاطا مع 10 مل من المحلول الملحي معقم Sterilized normal saline (NaCl 0.85%) اخذ جزء من العالق البكتيري بواسطة حلقة الناقل Loop المعقمة ولقح بها الوسط NA بطريقة التخطيط ، وضعت بعدها الاطباق الملقحة في الحاضنة بدرجة حرارة  $28 \pm 2$  درجة مئوية لمدة 24 ، نقل جزء من البكتريا النامية بواسطة لوب معقم وخطت على الوسط Nutrient Agar بطريقة التخطيط للحصول على مستعمرات مفردة Single Colony ، حضنت تحت نفس الظروف لمدة 24 ساعة واعطيت العزلات الرموز المذكورة في جدول رقم (2)

### 4.3. اختبار القدرة الإراضية لعزلات البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا:

#### 1.4.3. اختبار فرط الحساسية على التبغ Hypersensitive Reaction Test:

##### 2.1.4.3. زراعة و تحضير نباتات التبغ :

زرعت بذور نبات التبغ *Nicotiana tabacum* في خليط من تربة مزيجية و البتموس 1:2 (معقمة مسبقاً في جهاز الاوتوكليف بدرجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند /انج<sup>2</sup> لمدة 60 دقيقة وكررت عملية التعقيم بعد 24 ساعة وتحت نفس الظروف في صناديق بلاستيكية معقمة. وفردت النباتات في مرحلة 4 اوراق و نقلت إلى أصص بلاستيكية حاوية على خليط من التربة المزيجية و البتموس (1 نبات / اصص) و وضعت في البيت البلاستيكي لحين إجراء الاختبار.

##### 3.1.4.3. تحضير اللقاح البكتيري:

حضر الوسط NA وعقم بالمؤصدة على درجة الحرارة 121 درجة مئوية و ضغط 15 باوند/انج<sup>2</sup> لمدة 20 دقيقة و صب في اطباق بتري حجم 9 مل و بعد تصلب الوسط في الاطباق لقح بالعزلات البكتيرية و حضنت الأطباق بدرجة الحرارة  $28 \pm 2$  درجة مئوية لمدة 24 ساعة ثم غسل سطح النمو البكتيري باستعمال 5 مل من المحلول الملحي المعقم (NaCl 0.85%) Sterilized normal saline بعدها استخدمت طريقة العد Plate Count technique لتحضير اللقاح. إذ حضرت سلسلة من التخفيف من  $10^{-1}$  -  $10^{-8}$  من المعلق البكتيري للبكتريا المعزولة في أنابيب اختبار حاوية على المحلول الملحي المعقم Sterilized normal saline (NaCl 0.85%) . وضع واحد مل من كل من تخفيفات الثلاثة الأخيرة بواسطة ماصة معقمة خاصة لكل تخفيف في ثلاثة أطباق بتري معقمة. وصب مقدار 20 مل من الوسط الزرع NA بدرجة حرارة 45 درجة مئوية في كل طبق. حضنت الأطباق بدرجة الحرارة  $28 \pm 2$  درجة مئوية و اختير المعلق البكتيري ذي التركيز  $10^6$  وحدة تكوين مستعمرة /مل

## 4.1.4.3. تلقيح نباتات الاختبار:

لقت أوراق التبغ بطريقة حقن الأوراق Leaf infiltration و ذلك بحقن 1 مل من اللقاح البكتيري (التركيز  $10^6$  وحدة تكوين المستعمرة / مل) (Klment و Kiraly ، 1974) في الفراغ الخلوي لأوراق نباتات التبغ باستعمال Microsyring with needle 28 guage. وضعت النباتات الملقحة في البيت البلاستيكي وغطيت بأكياس بولي اثلين مثقبة لمدة 48 ساعة للمحافظة على الرطوبة مع المتابعة اليومية لحين ظهور الأعراض حقنت 4 أوراق لكل عزلة مع معاملة مقارنة استعمل فيها الماء المقطر المعقم في عملية الحقن. (Schaad وآخرون، 2001).

## 2.4.3. اختبار القدرة الامراضية على شرائح البطاطا:

أختيرت درنات سليمة ومنتظمة ومنتاسقة في الحجم قدر الامكان لإجراء إختبار الامراضية عليها، غسلت بالماء عدة مرات لأزالة الأتربة ،عقمت سطحياً باستخدام هايبيوكلورات الصوديوم NaOCl (الكور 5 %) تركيز 2% لمدة 3 دقائق ، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم مراتٍ عدة ، قطعت درنات البطاطا المعقمة الى شرائح متساوية سمكها 10 ملم تقريبا ، تم عمل حفرة في مركز كل شريحة بواسطة ثاقب فليبي معقم بقطر 5 ملم ووضعت في اطباق بتري معقمة (بعد وضع ورقة ترشيح معقمة تحتها) ، لقت الحفر بالعالق البكتيري للبكتريا قيد الدراسة بعمر 24 ساعة بمقدار 100 مايكروليتر /حفرة (تركيز  $10^6$  وحدة مكونة للمستعمرة/ مل )، وبواقع 6 شرائح لكل عزلة كل شريحة في طبق منفرد ، وضعت الاطباق الحاوية على الشرائح الملقحة في الحاضنة بدرجة حرارة  $28 \pm 2$  درجة مئوية ، وتمت متابعة تطور الإصابة لمدة 6 ايام ، اختيرت اشد العزلات ضراوة على اساس مساحة الجزء المتعفن المتضرر المتعفن من شرائح درنات البطاطا/ سم

وبناءً على نتائج اختباري القدرة الامراضية على اوراق نبات التبغ وعلى شرائح البطاطا اختيرت خمس عزلات (وهي الاسرع والاقوى في ظهور اعراض الاصابة في الفقرتين 1.4.3 و 2.4.3) لغرض اجراء الاختبارات اللاحقة عليها .

## 5.3 . تشخيص البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري :

أجريت الاختبارات المظهرية والكيموحيوية لتشخيص البكتريا المعزولة من درنات وسيقان البطاطا المصابة وفقا لما ذكره Krieb وDobereiner (1984) و Holt وآخرون (1994) و Schaad وآخرون (2001) وكما مبين ادناه .

### 1.5.3 . الصفات المجهرية والمظهرية للعزلات البكتيرية :

حضرت مسحة Smears من عزلات البكتريا النامية على وسط NA بعمر 24 ساعة على شرائح زجاجية نظيفة صبغت بصبغة كرام (Gram staining) ، وفحصت تحت المجهر الضوئي بأستعمال العدسة الشيئية بقوة تكبير (x100) وسجل تفاعل الخلايا البكتيرية مع الصبغة وشكل الخلايا وتجمعاتها فضلا عن لون و شكل وطبيعة نمو المستعمرات البكتريا على وسط NA . اعتمدت الخصائص التشخيصية التي ذكرها Holt وآخرون ، (1994) و Schaad ، (1988).

### 2.5.3 . قابلية النمو في بعض الاوساط الزرعية التفريقية:

#### 1.2.5.3 . طبيعة النمو ولونه على وسط Yeast extract – dextrose CaCO<sub>3</sub> :

حضر الوسط YDC باضافة 10 غم Yeast extract ، 20 غم Dextrose ، 20 غم Calcium Carbonate و 15 غم Agar إلى 1000 مل ماء مقطر معقم ،أذبيت المواد أعلاه في لتر من الماء المقطر الساخن ومزج المحلول جيداً باستعمال Vortex mixer ضبط الـ pH على 7.2 وعقم بالمؤصدة عند درجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند /انج<sup>2</sup> لـ 20 دقيقة. صب الوسط في أطباق معقمة ولقح بالعزلات البكتيرية قيد الدراسة حضنت الأطباق بدرجة حرارة 28±2 درجة مئوية لمدة 72 ساعة. وسجلت طبيعة النمو على هذا الوسط (Wilson وآخرون، 1967 و Krieg و Dobereiner، 1984 و Schaad وآخرون، 2001).

#### 2.2.5.3 . طبيعة النمو على وسط D-3 Agar :

حضر الوسط D-3 من إضافة 10.0 غم Sucrose ، 10.0 غم Arabinose ، 5.0 غم Casein ، 7.0 غم LiCl ، 3 غم Glycine ، 5 غم NaCl ، 0.3 غم MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ، 50 ملغم Sodium dodecyl sulfate ، 60.0 ملغم Bromthymol blue ، 100 ملغم Acid fuchsin و 15.0 غم Agar إلى 1000 مل ماء مقطر . ضبط الـ pH على 8.2 وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 درجة مئوية و ضغط 15 باوند/انج<sup>2</sup> لمدة 20 دقيقة . لقح الوسط من مزارع نامية على وسط NA بعمر 24 ساعة بطريقة التخطيط. حضنت الاطباق بدرجة 28 ± 2 درجة مئوية لمدة 72 ساعة ولوحظ وجود او انعدام نمو بكتيري على سطح الوسط ( Schaad وآخرون، 2001 ) وهو من الأوساط الانتخابية للجنس *Pectobacterium*.

### 3.2.5.3. طبيعة النمو على وسط Kings Medium (KB) :

حضر الوسط بإضافة: 20.0 غم Peptone ، 2.5 غم  $K_2HPO_4$  ، 6.0 غم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ، 15.0 غم Agar و 15 مل Glycerol إلى 1000 مل ماء مقطر . أذيتت مكونات الوسط في الماء المقطر الساخن وضبط ال pH على 7.2 وعقم بالمؤصدة عند درجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند / انج<sup>2</sup> لـ 20 دقيقة. وصب في الأطباق ولقح الوسط بالعزلات البكتيرية قيد الدراسة بطريقة التخطيط . حضنت المزارع البكتيرية بدرجة حرارة  $28 \pm 2$  درجة مئوية لمدة 72 ساعة (Schaad وآخرون، 2001).

### 4.2.5.3. وسط البكتات وكريستيل فايوليت Crystal violet – Pectate medium(CVP) :

حضر الوسط من : 3 مل كلوريد الكالسيوم المائي  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  (محلول 10%) ، 0.5 مل كريستيل فايوليت (محلول 75%) ، 45 مل هيدروكسيد الصوديوم NaOH ، 5 مل سليكون Silicon (محلول 0.001%) ، أذيتت جميع المواد في 200 مل ماء مقطر ساخن وتم غلي المحلول مع المزج بالمزج الكهربائي بسرعة عالية لمدة 15 ثانية وترك المحلول جانباً .

حضر المحلول الثاني والمكون من : 1 غم نترات الصوديوم ، 50 ملغم خلاصة الخميرة ، 4 غم كبريتات المنغنيز المائية ، 15 غم حامض بولي كالكثويورنك ، 1 غم Agar . اضيفت هذه المواد الى 300 مل ماء مقطر بدرجة الغليان ، خلطت مكونات المحلولين ومزجت مرة ثانية في المازج بسرعة عالية لمدة 30 ثانية ، وضع الخليط في ورق حجم 1 لتر وضبط pH على 7.2 وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند / انج<sup>2</sup> لمدة 20 دقيقة . يستخدم هذا الوسط للتمييز بين الجنسين *Pseudomonas* و *Pectobacterium* (Logan و O'neill ، 1975).

### 3.5.3 . الاختبارات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة:

#### 1.3.5.3 . إختبار الكاتليز Catalase :

اضيفت بضع قطرات من محلول مائي 3% بيروكسيد الهيدروجين  $H_2O_2$  الى النمو البكتيري على وسط NA (المجهز من شركة Condalab الأسبانية ) بعمر 24 ساعة اذ ان ظهور فقاعات غازية بعد عدة ثواني دلالة على إيجابية الإختبار (Winn و MacFaddin ، 2000 ، وآخرون ، 2006 ) .

**2.3.5.3. إختبار الأوكسيداز Oxidase:**

وضعت عدة قطرات من الكاشف Tetramethyl-P-phenyldiamine dihydrochlorie (والمحضر من إضافة 1 غم من المادة المذكورة اعلاه الى 100 مل ماء مقطر معقم ) على ورقة ترشيح ومن ثم نقل جزء من النمو البكتيري على جزء ورقة الترشيح المشبع بالكاشف و تم دكها بلطف بواسطة عود خشبي، ان ظهور اللون البنفسجي خلال 10 ثواني دلالة على ايجابية الاختبار (MacFaddin 2000).

**3.3.5.3. إختبار أحمر المثيل Methyl Red :**

حضر الوسط methyl red vogasproskeur (MR / VP) (المجهز من شركة Condalab الإسبانية ووضع في انابيب إختبار وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند / انج<sup>2</sup> لمدة 20 دقيقة وبعد التعقيم لقم بمستعمرات مفردة نقية من البكتريا بعمر 24 ساعة و وُضع في الحاضنة على درجة حرارة 28±2 درجة مئوية لمدة يومين الى ثلاثة أيام بعدها أضيفت 5 قطرات من كاشف أحمر المثيل Methyl Red ان ظهور اللون الأحمر دليل على إيجابية الإختبار ( Winn وآخرون ، 2006 ) .

**4.3.5.3. إختبار فوكس - بروسكار Voges - Proskauer :**

حضر الوسط methyl red vogasproskeur (MR / VP) (المجهز من شركة Condalab الإسبانية) ووضع في انابيب إختبار وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند / انج<sup>2</sup> لمدة 20 دقيقة وبعد التعقيم لقم بمستعمرات مفردة نقية من البكتريا بعمر 24 ساعة و وُضع في الحاضنة على درجة حرارة 28±2 درجة مئوية لمدة 24 ساعة وبعد انتهاء وقت التحضين نقل 1 مل من الوسط الى انبوبة اختبار نظيفة، أضيف 0.6 مل من الكاشف 5%  $\alpha$ -naphthol ثم اضيف 0.2 مل من 40 % KOH، رجت الانابيب برفق وتركت لمدة 10 - 15 ثانية ، ان تغير لون الوسط الى اللون الاحمر بعد 15 ثانية او اكثر دلالة على ايجابية الاختبار (Winn وآخرون، 2006).

**5.3.5.3 إختبار فنيل ألانين Phenylalanine :**

حُضِرَ وسط Phenylalanine agar (المجهز من شركة Sigma-Aldrich الألمانية) بأضافة 28غم من الوسط الى 1000مل ماء مقطر معقم ثم وزع في انابيب اختبار و عُقِمَ في جهاز المؤصدة بدرجة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند/انج<sup>2</sup> لمدة 20 دقيقة بعدها وضعت الانابيب بشكل مائل لحين تصلبها، ثم لقت بمستعمرة مفردة نقية من البكتريا قيد الدراسة، وحضنت على درجة حرارة 28±2 درجة مئوية لمدة 48 ساعة. ثم اضيف 4-5 قطرات من كاشف Ferrie chloride عند انتهاء فترة التحضين مباشرة الى سطح الوسط ، ان ظهور اللون الأخضر هو دلالة على ايجابية الاختبار (Winn و 2000, MacFaddin, وأخرون ، 2006) .

**6.3.5.3. تحلل النشا Starch hydrolysis :**

استخدم لهذا الإختبار وسط النشا الصلب Starch agar والذي حضر من اذابة 15.0غم Agar ، 4.0غم Starch و 3.0غم Beef extract و 5.0غم Peotone في 1000مل من الماء المقطر اذ اذيبت المواد وضبط pH على 7.2. وعقم بالموصدة بدرجة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند /انج<sup>2</sup> لمدة 20 دقيقة ، صب الوسط في اطباق بتري معقمة وترك حتى يتصلب، لقت بالعزلات البكتيرية قيد الدراسة النامية على وسط NA بعمر 24 ساعة بطريقة التخطيط ،حضنت المزارع البكتيرية بدرجة حرارة 28±2 درجة مئوية لمدة 3-7 ايام. بعدها اضيف لكل طبق 0.3 مل من المحلول الكاشف عن تحلل النشا (الذي يتكون من 1 غم يود و 2.0 غم يوديد البوتاسيوم KI في 300 مل ماء مقطر)، ووزع على سطح الوسط الزرع فوق المستعمرات البكتيرية النامية. أن وجود مناطق شفافة حول النمو البكتيري وعدم ظهور اللون الازرق دلالة على ايجابية الإختبار ( MacFaddin ، 2000).

**7.3.5.3. تمييع الجيلاتين Gelatin liquefaction :**

حضر الوسط من اذابة 3 غم Beef extract ، 5.0 غم Peotone ، 12 غم Gelatin في 1000 مل ماء مقطر مع التسخين لاذابة الجيلاتين . عدل pH الى 7.0 ، وزع الوسط في انابيب اختبار وعقم بالموصدة بدرجة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند /انج<sup>2</sup> لمدة 20 دقيقة ،لقت الوسط بعد تصلبه بالعزلات البكتيرية قيد الدراسة من مزارع نامية على الوسط NA بعمر 24 ساعة بطريقة الوخز بواسطة ابرة التلقيح المعقمة، حضنت الانابيب بدرجة حرارة 28±2 درجة مئوية لمدة 24 ساعة ان تحول قوام الوسط من الصلب الى السائل يشير الى تفاعل موجب (Schaad, 1980 و Winn وأخرون ، 2006) .

**8.3.5.3. النمو في وسط Nutrient Broth:**

حُضِرَ وسط NB (المجهز من شركة Difco) pH=7.2 و وُزِعَ في انابيب إختبار وعقم بالمؤصدة بدرجة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند/انج<sup>2</sup> لمدة 20 دقيقة ثم لقع بمستعمرات بكتيرية بعمر 24 ساعة وحُضِنَت بدرجة حرارة 28±2 درجة مئوية لمدة 72 ساعة مع ملاحظة النمو من عدمه في الوسط .

**9.3.5.3. إختبار النمو في درجة حرارة 35 درجة مئوية:**

حضر وسط NA المجهز من شركة المجهز من شركة Condalab الأسبانية وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند /انج<sup>2</sup> لمدة 20 دقيقة ثم لقع من مستعمرات بكتيرية بعمر 24 ساعة بطريقة التخطيط وحضنت في درجة حرارة 35 درجة مئوية لمدة 48 ساعة لملاحظة النمو من عدمه (Scchad، 1980).

**10.3.5.3. إختبار النمو في وسط حاوي على 5% NaCl:**

حضر 100 مل من الوسط NA واطيف له 5% NaCl وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند /انج<sup>2</sup> لمدة 20 دقيقة ثم لقع من مستعمرات بكتيرية بعمر 24 ساعة وحضنت في درجة حرارة 28±2 درجة مئوية لمدة 24 ساعة لملاحظة النمو من عدمه (Schaad وآخرون، 2001).

**6.3. التشخيص الجزيئي للعزلة البكتيرية Pcc1 باستعمال تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وتحديد التسلسل القواعد النيتروجينية:**

**1.6.3. استخلاص الحامض النووي (DNA) :**

تم استخلاص الحامض النووي (DNA) من عزلة البكتريا باستخدام العدة (Cat. No. D6005)،

(USA) المجهزة من قبل شركة Zymo Research و باتباع الخطوات الموصى بها و المثبتة ادناه:

1- لقع الوسط المغذي السائل (Nutrient Broth) بمستعمرة بكتيرية مفردة منماة على Nutrient agar و حضن بدرجة حرارة 28±2 درجة مئوية لمدة 24 ساعة في حاضنة هزازة (Shaking incubator).

- 2- نقل 1.5 مل من الوسط الحاوي على البكتريا الى انبوبة اختبار سعة 2 مل و اجريت لها عملية الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة بسرعة 13000 دورة/ دقيقة ،اهمل الراشح و احتفظ بالجزء المترسب او المتجمع في اسفل الانبوبة.
- 3- اضيف 750 مايكروليتر من محلول التحلل (Lysis Solution) لتحويل الجزء المتجمع في قعر الانبوبة الى محلول عالق لنقله الى انبوبة اخرى تحتوي حبات او كرات صغيرة ( ZR Bashing Bead™ Lysis Tube) تساعد على تحطيم جدار الخلايا و تحرر الحامض النووي منها و باستخدام جهاز هزاز (Vortex).
- 4- اجريت عملية الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة/ دقيقة و لمدة 10 ثواني لتجميع المحلول و ترسيب بعض المواد في اسفل الانبوبة.
- 5- نقل حوالي 400 مايكروليتر من الجزء الطافي (Supernatant) الى انبوبة (Zymo-Spin™ IV) Spin Filter (Orange Top) التي تحتوي على مرشح (Filter) و الموضوع في انبوبة جمع (Collection Tube). اجريت عملية الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة/ دقيقة و لمدة دقيقة واحدة.
- 6- اضيف 1200 مايكروليتر من المحلول Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer الى الراشح الناتج من الخطوة رقم 5.
- 7- نقل 800 مايكروليتر من الخليط الناتج من الخطوة رقم 6 الى عمود الفصل (Zymo-Spin™ IIC Column) الموضوع في انبوبة جمع (Collection Tube) و اجريت عملية الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة للتخلص من الراشح الموجود في انبوبة الجمع مع اعادة هذه الخطوة مرة اخرى مع المحلول المتبقي الخطوة رقم 6.
- 8- اضيف 200 مايكروليتر من المحلول DNA Pre-Wash Buffer الى عمود الفصل (Zymo-Spin™ IIC Column) الموضوع في انبوبة جمع جديدة و إخضعت لعملية الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة/ دقيقة لمدة دقيقة واحدة.
- 9- اضيف 500 مايكروليتر من المحلول Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer الى انبوبة الفصل (Zymo-Spin™ IIC Column) ثم اجريت عملية الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة.
- 10- نقلت انبوبة الفصل (Zymo-Spin™ IIC Column) الحاوية على الغشاء المرتبط به الحامض النووي المستخلص الى انبوبة جديدة (1.5 مايكروليتر) و اضيف محلول Elution Buffer الى مركز الغشاء و تركت بصورة عمودية لمدة دقيقة واحدة في درجة حرارة الغرفة.

11- اجريت عملية الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة/ دقيقة و لمدة دقيقة واحدة للحصول على الحامض النووي (DNA) لغرض قياس تركيزه و نقاوته و حفظة في درجة حرارة -20 درجة مئوية لحين الاستعمال.

### 2.6.3. قياس تركيز و نقاوة مستخلص الحامض النووي (DNA) :

تم قياس تركيز الحامض النووي (DNA) باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) و بطول موجي 260nm و لغرض معرفة التركيز للحامض النووي DNA فقد اتبعت المعادلة التالية:

تركيز الحامض النووي ( $\mu\text{g/ml}$ ) = مقدار الامتصاص الضوئي على طول موجي  $260\text{nm} \times 50 \times$  عامل التخفيف (Dilution factor)

و لمعرفة نقاوة لحامض النووي (DNA) تم تطبيق المعادلة الآتية و الموصوفة من قبل William و آخرون (1997):

$$\text{نقاوة الحامض النووي} = \frac{\text{مقدار الامتصاص على طول موجي } 260 \text{ nm}}{\text{مقدار الامتصاص على طول موجي } 280 \text{ nm}} = \text{DNA (DNA purity)}$$

### 3.6.3. استخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لمضاعفة الجين 16S rRNA:

لغرض تشخيص العزلة البكتيرية Pcc1 المعزولة من درنات البطاطا المصابة، حسب Eden و آخرون (1991) أستنبطت البادئات المبينة في الجدول (3) الخاصة بتضخيم منطقة الوحدة الفرعية الصغيرة Small Subunit rRNA المستعملة في هذه الدراسة من قبل NCBI-GenBank وتم اجراء اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام العُدّة (Maxime PCR PreMix i-Taq)، (Cat. No. 25026) و المجهزة من قبل شركة iNtRoN الكورية.

جدول (3) صفات البادئ المستخدم في تشخيص البكتيريا المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا

المصدر	حجم الحزمة (BP)	اسم البادئ	تسلسل البادئ من (5'-3')
Eden واخرون 1991	1500	Forward primer Nem-16S-F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3'
		Reverse primer Nem-16S-R	5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

### 4.6.3. تحضير تفاعلات مضاعفة الجين 16s rRNA:

جرى العمل داخل جهاز التعقيم الهواء الطبقي في ظروف معقمة مع ارتداء القفازات ، وحضر تفاعل مضاعفة الجين 16s rRNA باستعمال المزيغ الخاص بتفاعل انزيم البلمرة المتسلسل و ذلك بإضافة كل المكونات التي يحتاجها التفاعل وبعدها تمت اضافة المكونات الاخرى لمزيغ التفاعل و حسب التعليمات الشركة المصنعة كما في (الجدول4):

### (جدول 4) مكونات وحجوم مزيغ التفاعل انزيم البلمرة المتسلسل PCR

PCR Master mix	Volume $\mu$ L
DNA template	5
Forward primer (10 pmol)	3
Reveres primer (10 pmol)	3
PCRfree nuclease water	14
Pre mix	25
Total volume	50

بعد ذلك غلقت جميع الأنابيب ومزجت المكونات بجهاز الطرد المركزي Exispin vortex عند 3000 دورة / دقيقة لـ 3 دقائق ونقلت الأنابيب المحتوية على المزيغ الى جهاز المدور الحراري ( PCR thermocycler conditions) لأجراء تفاعل البلمرة المتسلسل بعدها ضبطت الدورات الحرارية بحسب (الجدول5).

## (جدول5) برنامج تضاعف الجين 16S rDNA بواسطة المضخم الحراري

عدد الدورات	الوقت	درجة الحرارة درجة مئوية	عدد الدورات
1	3 دقائق	94	مرحلة المسخ الاولي Intial Denaturation
35 دورة	45 ثانية	94	مرحلة المسخ النهائي Final Denaturation
	45 ثانية	56	الالتحام (التصاق) primer Annealing
	60 ثانية	72	الاستطالة الأولية Initial elongation
1	7 دقائق	72	مرحلة الاستطالة النهائية Final elongation
-	Forever	4	المرحلة النهائية للخرن Storing

## 5.6.3. الترحيل الكهربائي باستخدام هلام اكاروز:

حضر هلام اكاروز جل حسب طريقة Sambrook واخرون (1989) واجريت عملية الترحيل الكهربائي بحسب الخطوات الآتية :

1- حضرت طبقة هلام اكاروز (Agarose gel) بعد اخذ وزن 1غم من مسحوق اكاروز و إذابته في 100مل من المحلول الدارئ (Tris boric acid EDTA buffer)  $1 \times TBE$  و لحين تحول الخليط إلى محلول رائق.

2- أضيف 5 مايكروليتر من صبغة الـ Ethidium bromide بعد انخفاض درجة حرارة المحلول الى 40-45 درجة مئوية.

3- جهز القالب (Agarose gel tray) الخاص بصب اكاروز و الحاوي على المشط في إحدى نهاياته لعمل حفر داخل طبقة الجل، ثم صب اكاروز المذاب و الحاوي على صبغة الـ Ethidium bromide ، و ترك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة.

4- عند تصلب طبقة اكاروز، رفع المشط بحذر وأعيد القالب إلى مكانه في جهاز الترحيل، ثم أضيف محلول  $1 \times TBE$  إلى حوض الترحيل (Electrophoresis tank) مغطيا طبقة اكاروز بارتفاع 1 سم تقريباً.

5- اضيف 10 مايكروليتر من الحامض النووي المضاعف بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) الى كل حفرة (Well) من حفر طبقة هلام اكاروز المحضرة سابقا. كما اضيفت 5 مايكروليتر من الحامض النووي DNA المعياري (Ladder) الى الحفرة الموجودة في الجانب الايسر من العينات المضافة لغرض تحديد احجام الحامض النووي المضاعف. أوصلت أقطاب مجهز الطاقة (Power supply) بالتيار الكهربائي و شغل على 150 ملي امبير و لمدة ساعة واحدة.

6- تم إيقاف الترحيل الكهربائي عند وصول محلول التحميل الأزرق إلى ما قبل نهاية الهلام ب 2 سم تقريبا.

7- فحصت طبقة هلام اكاروز الحاوية على حزم الحامض النووي (PCR products) تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV transillumination) و اخذت صور لها.

### 6.6.3. تحليل تسلسل القواعد النيتروجينية للحامض النووي (DNA) للعزلة البكتيرية Pcc1 :

لغرض تشخيص العزلة البكتيرية، ارسلت نواتج الحامض النووي (PCR amplicons) المضاعفة من العزلة البكتيرية Pcc1 فضلا عن البوادي (Reverse primer Nem-16S-R و Forward primer Nem-16S-F) الى شركة Macrogen (كوريا الجنوبية) لتحديد تسلسل القواعد النيتروجينية (Nucleotide sequence) لنواتج الحامض النووي DNA المضاعفة وبالاجاهين الامامي و الخلفي. حلت بعد ذلك جميع التسلسلات للقواعد النيتروجينية بواسطة برنامج BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) و تمت مقارنة النتائج مع ما متوفر من البيانات المشخصة عالميا و العائدة لنفس البكتريا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية National Center for Biotechnology Information (NCBI).

### 7.6.3. دراسة القرابة الوراثية للعزلة البكتيرية Pcc1 المشخصة:

تم تحليل التسلسل النيوكليوتيدي لـ (DNA) لغرض التعرف على مدى التقارب الوراثي بين السلالة البكتيرية المشخصة و سلالات أخرى من قاعدة بيانات NCBI وتم معالجة جين تسلسل النيوكليوتيد الذي تم الحصول عليه بواسطة البرنامج BioEdit إذ تم تحليله باستعمال تعريف محاذاة <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>، وبذلك تم رسم شجرة التحليل الوراثي (Phylogenetic trees analysis) باستخدام برنامج MEGA7 (Kumar و اخرون، 2016).

### 7.3. حساسية اصناف البطاطا للبكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (العزلة Pcc1)

ومحتوى الاصناف من المادة الجافة و النشا وعنصر الكالسيوم:

اجريت تجربة اختبار حساسية الاصناف على 5 من اصناف البطاطا المتوفرة التي تزرع في العراق وهي : Arizon، Elbida، Revera، Burren، ElMundo ، واجريت عليها عملية العدوى بالبكتريا *P. carotovorum carotovorum* (Pcc1) كما في الفقرة 2.3.4. اذ اختبرت 10 درنات من كل صنف و عقت سطحيا باستخدام هايپوكلورات الصوديوم NaOCl (الكلور 1 %) تركيز 2% لمدة

3دقائق ، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم مراتٍ عدة وقطعت كل درنة الى نصفين بشكل طولي، تم عمل حفرة في منتصف كل نصف درنة (20 نصف) بقطر 5 ملم وعمق 5 ملم قيل نصف ساعة من التلقيح ووضعت الدرنات في حاويات بلاستيكية معقمة ابعادها 12×8 سم حاوية على ورق ترشيح معقم ومرطب واضيف لكل حفرة 50 مايكروليتر من العالق البكتيري للعزلة Pcc1 مع مراعاة تحريك العالق البكتيري لتجنب ترسيب الخلايا، واغلقت الحاويات لضمان توفير الرطوبة النسبية داخل الحاويات وتركت في الحاضنة في اجواء مظلمة لمدة 6 ايام على درجة حرارة 28±2 درجة مئوية، ازيلت الانسجة المتعفنة بعناية من كل نصف درنة بواسطة ملعقة صغيرة وملئ التجويف المتكون بعد ازالة النسيج المتعفن بالماء بواسطة ماصة مدرجة، ان حجم الماء اللازم لملئ التجويف/ سم<sup>3</sup> يمثل حجم النسيج المتعفن نفذت التجربة بخمسة مكررات لكل معاملة كل مكرر يحوي اربع انصاف من البطاطا(مع معاملة مقارنة و بعدد المكررات نفسها) (Pasco واخرون، 2006)

قيست حساسية الأصناف للأصابة بالبكتريا *P. carotovorum carotovorum* اعتماداً على الصفات التالية:

### 1.7.3. تقدير النسبة المئوية للمادة الجافة:

اخذت قطع من درنات البطاطا لكل صنف ووزنت ثم جففت في فرن كهربائي Oven عند درجة حرارة 70 درجة مئوية ولمدة 72 ساعة لحين ثبات الوزن وبعد انتهاء التجفيف وزنت العينات وحسبت النسبة المئوية للمادة الجافة من المعادلة الآتية:

النسبة المئوية للمادة الجافة = الوزن الجاف للعيونة / الوزن الطري للعيونة × 100 (الصحاف، 1989)

### 2.7.3. النسبة المئوية للنشأ في الدرنات:

قُدِّرت النسبة المئوية للنشأ على وفق المعادلة الآتية:

% للنشأ = 17.55 + 0.891 (النسبة المئوية للمادة الجافة - 24.182). (A.O.A.C، 1970)

## 3.7.3. تقدير عنصر الكالسيوم:

تم تقدير عنصر الكالسيوم في درنات أصناف البطاطا بعد وقيل الأصابة لكل صنف بثلاثة مكررات، غسلت درنات البطاطا ثم اخذت قطع منها و جففت في فرن كهربائي بدرجة حرارة 70 درجة مئوية لمدة 72 ساعة ولحين ثبات الوزن. طُحنت العينات جيدا" بطاحونة كهربائية، وأخذ منها 0.2 غم وضعت العينات في دوارق الهضم وأضيف لها 3 مل من حامض الكبريتيك المركز ( $H_2SO_4$ ) وتركت لمدة 24 ساعة ثم أضيف 1 مل من خليط حامض الكبريتيك وحامض البيركلوريك ( $HClO_4$ ) المركزين 1:1، وضعت دوارق الهضم على صفيحة ساخنة (Hot plate) لوحظ عندها تصاعد أبخرة بيضاء وتغير لون العينات بشكل تدريجي حتى الحصول على محلول رائق عديم اللون، بردت العينات وأكمل الحجم لكل عينة إلى 50 مل بإضافة الماء المقطر كما جاء في طريقة Parsons و Cresser (1979). تم تقدير الكالسيوم بواسطة جهاز Flame spectrophotometer وفق طريقة Brown و Lilliland (1946).

### 8.3. اختبار المدى العائلي لعزلة البكتريا الممرضة *P. carotovorum subsp. carotovorum* (Pcc1) المسببة التعفن الطري على البطاطا:

لغرض اخبار المدى العائلي للعزلة البكتيرية قيد الدراسة *P. carotovorum* (Pcc1) اختيرت الثمار السليمة للبطاطا، الباذنجان، الشلغم، الشمندر، الخيار، الفجل، الجزر، اليقطين، البصل والبروكلي، اذ اختيرت ثمار سليمة لإجراء هذا الاختبار، عقت سطحيا بأستخدام هايبيكلورات الصوديوم NaOCl (الكلور 5%) تركيز 2% لمدة 3 دقائق و بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم اكثر من مرة للتخلص من المادة المعقمة، قطعت الثمار الى شرائح متساوية سمكها 10 ملم تقريبا، وكررت نفس الخطوات المتبعة في الفقرة 2.4.3 فيما يخص طريقة تلقیح الشرائح بالبكتريا *P. carotovorum carotovorum* (Pcc1)، وضعت الشرائح في حاويات بلاستيكية معقمة ابعادها 8×12 سم حاوية على ورق ترشيح معقم ومرطب واغلقت الحاويات لضمان توفير الرطوبة النسبية داخل الحاويات وتركت في الحاضنة في درجة حرارة 28±2 درجة مئوية لمدة 6 ايام، نفذت التجربة على وفق التصميم العشوائي الكامل CRD وبأربع مكررات لكل معاملة مع معاملة المقارنة لشرائح ملقحة بالماء المقطر المعقم، سجلت النتائج بقياس مساحة الجزء المتعفن من الثمار السابقة الذكر

9.3. مكافحة البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc1) المسببة لمرض

التعفن الطري على البطاطا:

استخدمت عوامل المكافحة الأحيائية والكيميائية المدرجة في جدول (6) في مكافحة البكتريا *P. carotovorum carotovorum* المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا.

جدول 6: العوامل المستخدمة في مكافحة البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا

ت	عوامل التجربة	التركيز المستخدم	الشركة المصنعة للمبيد ومصدر الحصول على العزلات الفطرية والبكتيرية	المنشأ	صورة المبيدات والمواد النانوية
1	<i>B.subtilis</i>	$10^6 \times 1$ وحدة تكوين مستعمرة/مل	تم الحصول عليها من مختبر الدراسات العليا/ قسم وقاية النبات	—	—
2	<i>A. chroococcum</i>	$10^6 \times 1$ وحدة تكوين مستعمرة/مل	مختبر الدراسات العليا/ قسم وقاية النبات	—	—
3	<i>T.harzianum</i>	$10^6 \times 1$ بوغ/ مل	مختبر الدراسات العليا/ قسم وقاية النبات	—	—
4	Beltanol	1.00 مل/لتر	Probelte	اسبانيا	مركز قابل للذوبان في الماء
5	Ganger	1.25 مل / لتر	HangzhouTianlong Biotechnology	الصين	مركز قابل للذوبان في الماء
6	Goldstone	2 غم/لتر	HangzhouTianlong Biotechnology	الصين	حبيبات قابلة للانتشار
7	Nordox	1.25 غم/لتر	Nordox	النرويج	حبيبات قابلة للانتشار
8	أوكسيدالمغنيسيوم النانوي MgONPs	0.5 و 1.25 و 2.5 و 4.5 غم/ لتر	MK Nano	كندا	مسحوق قابل للبلل
9	أوكسيد الزنك النانوي ZnONPs	0.5 و 1.25 و 2.5 و 4.5 غم/ لتر	MK Nano	كندا	مسحوق قابل للبلل

### 1.9.3. إختبار القدرة التضادية للبكتريا *B.subtilis* و *A.chroococcum* والفطر *T.harzianum*

ضد البكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* (Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط الزراعي NA:

استعمل المقاوم الحيوي *B.subtilis* و *A. chroococcum* والفطر *T.harzianum* في مكافحة البكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* بطريقة الزرع المزدوج (DCT) Dual Culture Technique اذ قسمت الأطباق الحاوية على الوسط الزراعي (NA) إلى نصفين متساويين ولقح مركز النصف الأول بالبكتريا الممرضة *P. carotovorum subsp. carotovorum* بطريقة التخطيط ولقح مركز النصف الثاني للطبق وبطريقة التخطيط لبكتريا المقاومة مجهزة مسبقا بعد تنشيطها على وسط NB كل على انفراد اما معاملة فطر المقاومة والبكتريا الممرضة فقد لقح مركز النصف الأول بالبكتريا الممرضة *P. carotovorum subsp. carotovorum* بطريقة التخطيط ولقح النصف الثاني بقرص قطره 5 ملم اخذ بواسطة ثاقب فليبي من حافة مستعمرة حديثة للفطر *T.harzianum* بعمر 7 ايام ، لقت انصاف اطباق للمقارنة بقرص من مستعمرة فطر المقاومة وبطريقة التخطيط لبكتريا المقاومة كل على انفراد أما معاملة المقارنة أجريت بتخطيط البكتريا الممرضة على الوسط الغذائي (NA) واشتملت كل معاملة على أربعة مكررات. حُضنت الأطباق في  $28 \pm 2$  درجة مئوية حسب درجة التضاد تبعاً Korsten وآخرون (1995) وفقاً للمعادلة الآتية:

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{النمو في المقارنة} - \text{النمو في المعاملة}}{100} \times 100$$

النمو في المقارنة

### 2.9.3. إختبار القدرة التضادية للبكتريا *B.subtilis* و *A.chroococcum* والفطر

*T.harzianum* ضد البكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* (Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على شرائح البطاطا مختبرياً:

استخدمت الطريقة المتبعة من قبل Abdel-Alim وآخرون (2002) مع تغييرات طفيفة لاختبار القدرة التضادية للبكتريا *B.subtilis* و *A.chroococcum* والفطر *T.harzianum* ضد البكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا، إذ عقت درنات البطاطا (صنف Arizona) سطحياً باستخدام هايبيوكلورات الصوديوم NaOCl (الكور 5 %) تركيز 2% لمدة 3 دقائق و بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم اكثر من مرة للتخلص من المادة المعقمة، قطعت

الدرنات الى شرائح قطرها 10 سم و تم عمل حفرة في وسط كل شريحة بواسطة ثاقب فليني قطر 5 ملم و اضيف لكل حفرة 50 مايكروليتر من البكتريا المضادة والفطر المضاد (بعد اضافة 5 مل ماء مقطر معقم وحصاد السبورات) كلاً على انفراد وبالتراكيز المذكورة في الجدول 6 ، و50 مايكروليتر من البكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* العزلة Pcc1، وضعت الشرائح في حاويات بلاستيكية معقمة وضع بداخلها ورق ترشيح معقم تم ترطيبه بماء مقطر معقم لضمان توفير الرطوبة اللازمة، وضعت الحاويات في الحاضنة على درجة 28±2 درجة مئوية لمدة 48 ساعة، نفذت التجربة على وفق التصميم العشوائي الكامل CRD وبعشرة مكررات (عشرة شرائح) لكل معاملة مع معاملة المقارنة للبكتريا الممرضة فقط وبنفس عدد المكررات تم قياس قطر النسيج المتعفن بواسطة المسطرة، وحسبت النسبة المئوية للتنشيط حسب معادلة Abbott (1925):

معدل قطر النسيج المتعفن للبكتريا الممرضة - معدل قطر النسيج المتعفن (البكتريا الممرضة+عامل مكافحة الحيوي)

$$\% \text{ للتنشيط} = \frac{\text{معدل قطر النسيج المتعفن للبكتريا الممرضة}}{100} \times$$

معدل قطر النسيج المتعفن للبكتريا الممرضة

**3.9.3. تقييم كفاءة المبيدات الكيميائية Beltanol ، Ganger ، Goldstone و Nordox في البكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* (Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط NA:**

لغرض معرفة تأثير المبيدات الكيميائية على نمو البكتريا *P. carotovorum carotovorum* حضرت 4 دوارق زجاجية يحوي كل منها 250 مل من الوسط الزراعي NA المعقم. بعد انخفاض درجة حرارة الوسط الى 45 درجة مئوية، أضيفت المبيدات Beltanol ، Ganger ، Goldstone و Nordox إلى الدوارق بالتراكيز الموصى بها من قبل الشركات المصنعة 1.00 مل / لتر ، 1.25 مل / لتر ، 2.00 غم / لتر ، 1.5 غم / لتر على التوالي كل على انفراد ثم رجبت الدوارق جيدا وصبت الاوساط المضاف لها المبيدات في اطباق بتري معقمة مضاف لها عالق البكتريا الممرضة ( العزلة Pcc1) بعمر 24 ساعة ، بعدها حضنت الاطباق في درجة حرارة 28±2 درجة مئوية لمدة 48 ساعة نفذت التجربة على وفق التصميم العشوائي الكامل CRD وبأربع مكررات لكل معاملة مع معاملة المقارنة للبكتريا بدون استخدام مبيد و بعدد المكررات نفسها .

سجلت النتائج بحساب عدد المستعمرات في كل من المعاملات و المقارنة ومنها استخرجت النسبة المئوية للتثبيط على وفق المعادلة :

$$\text{النسبة المئوية لتثبيط النمو (\%)} = \frac{\text{عدد المستعمرات في المقارنة} - \text{عدد المستعمرات في المعاملة}}{\text{عدد المستعمرات في المقارنة}} \times 100$$

### 4.9.3. تأثير المبيدين الكيميائيين Goldstone و Beltanol في نمو عزلات الفطر *T.harzianum* و البكتريا *A.chroococcum* مختبرياً

حضر الوسط الزراعي NA في دوارق زجاجية حجم كل منها 250 مل وعقم بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121م° و ضغط 15باوند/ انج<sup>2</sup> لمدة 20 دقيقة. بعد انتهاء التعقيم و انخفاض درجة الحرارة الى مرحلة قبل التصليب ، اذ استخدم التركيز الموصى به لكل مبيد فضلا عن استخدام تركيز اقل من الموصى به اضيف المبيدين Goldstone و Beltanol بالتركيز 0.75،1.00مل/لتر و 1.5،2.00غم/لتر على التوالي كلا على انفراد مع المزج الجيد مع الوسط الزراعي, صب الوسط الزراعي في اطباق بتري معقمة بعد تصلب الوسط لبح مركز كل طبق بقرص قطر (0.5 سم) مأخوذ من مستعمرات الفطريات بعمر سبعة ايام و بثلاث مكررات لكل معاملة، اما بالنسبة للبكتريا *A.chroococcum* نشطت على وسط NB وبعمر 24ساعة ثم لقت الأطباق بطريقة التخطيط و نفذت معاملة مقارنة بدون اضافة المبيدين الى الوسط الزراعي (NA)وبعد المكررات نفسها ، حضنت الاطباق لمدة 6 ايام بدرجة حرارة 25±2م° و سجلت النتائج واستخرجت النسبة المئوية للتثبيط كما ذكر في الفقرة 3.9.3

### 5.9.3. تقييم كفاءة أوكسيد المغنيسيوم النانوي (MgONPs) و اوكسيد الزنك النانوي (ZnONPs) في تثبيط نمو البكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* (Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط NA:

حضرت 8 دوارق زجاجية يحوي كل منها 250 مل من الوسط الزراعي NA المعقم. بعد انخفاض درجة حرارة الوسط ، أضيف أوكسيد المغنيسيوم النانوي (MgONPs) و اوكسيد الزنك النانوي (ZnONPs) بالتركيز 0.5 و 1.25 و 2.5 و 4.5غم/لتر و كلا على انفراد، رجت الدوارق جيدا و صببت في أطباق بتري معقمة مضاف لها 1مل العالق البكتيري (العزلة Pcc1) بعمر 24 ساعة، بعدها حضنت الاطباق في درجة حرارة 28±2 درجة مئوية لمدة 48 ساعة نفذت التجربة على وفق التصميم العشوائي الكامل CRD و بأربع مكررات لكل معاملة مع معاملة المقارنة للبكتريا بدون استخدام المادة النانوية و بعدد المكررات نفسها . سجلت النتائج بحساب عدد المستعمرات في كل من المعاملات و المقارنة ومنها استخرجت النسبة المئوية للتثبيط بأستخدام نفس العادلة الواردة في الفقرة 3.9.3

10.3. تقييم كفاءة الفطر *T.harzianum* والبكتريا *A. chroococcum* واوكسيد المغنيسيوم النانوي والمبيدين الكيميائيين Beltanol وGoldston والتكامل بينهم في مكافحة البكتريا *P. carotovorum carotovorum* (Pcc1) تحت ظروف البيت البلاستيكي:

عمق مزيج من التربة و البنموس (1:2) في جهاز المؤصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند/انج<sup>2</sup> لمدة ساعة واحدة وليومين متتاليين بعدها جُهِز بيت بلاستيكي تابع لقسم وقاية النبات ،زرعت درنات البطاطا في التربة المعقمة في اصص بلاستيكية سعة 5 كغم، نفذت التجربة في العروة الربيعية لزراعة البطاطا لعام 2021 و في ظروف البيت البلاستيكي .

اختير الصنف Arizona لتنفيذ هذه التجربة كونه اكثر الاصناف حساسية للإصابة بمرض التعفن الطري، إذ اخذت درنات بطاطا خالية من الاصابة وبأحجام متجانسة، عقت سطحيا بأستخدام هايپوكلورات الصوديوم NaOCl (الكلور 1 %) تركيز 2% لمدة 3 دقائق ، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم مراتٍ عدة وتركت لحين جفافها، تم عمل ثلاثة جروح متباعدة عن بعضها في كل درنة، اجريت طريقة العمل حسب القرغولي (1999) و Lopez و آخرون (2001) مع تغييرات طفيفة.

نُفذت التجربة بتاريخ 2021/1/12 من خلال تغطية درنات البطاطا لمدة 30 دقيقة بالماء المقطر المعقم او العالق البكتيري تركيز  $10^6 \times 1$  وحدة تكوين مستعمرة/ مل و اضيف Beltanol بتركيز 1.00 مل/لتر و الGoldstone بتركيز 2.00 غم/لتر وبمقدار 10 مل /كغم تربة بعد الزراعة مباشرة، اما اوكسيد المغنيسيوم النانوي فقد استخدم بتركيز 4.5 غم/لتر رشا على المجموع الخصري بعد الانبات بعشرة ايام فضلا عن الفطر *T.harzianum* والبكتريا *A. chroococcum* بتركيز  $10^6 \times 1$  اذ غطست الدرنات في العالق البكتيري وكلٌّ على انفراد بعد 30 دقيقة من التغطية بعالق البكتريا الممرضة .ووفقا لذلك فقد نفذت المعاملات الاتية:

#### المعاملات

1- تغطية درنات البطاطا بالماء المقطر فقط لمدة 30 دقيقة.

2- تغطية درنات البطاطا بدون تجريح بعالق البكتريا الممرضة فقط 30 دقيقة.

3- تغطية درنات البطاطا المجرحة بعالق البكتريا الممرضة فقط 30 دقيقة.

4- نباتات سليمة بعمر 10 ايام +أوكسيد المغنيسيوم النانوي رشا.

5- درنة سليمة +مبيد Beltanol.

6- درنة سليمة +مبيد Goldstone .

7- درنة سليمة + *T. harzianum*

8- درنة سليمة + *A. chroococcum*

- 9- درنات مغطسة بعالق Pcc1 بعمر 10 ايام+ أوكسيد المغنيسيوم النانوي رشاً بعمر 10 أيام.
- 10- درنات مغطسة بعالق Pcc1 + مبيد Beltanol .
- 11- درنات مغطسة بعالق Pcc1 + مبيد Goldstone .
- 12- درنات مغطسة بعالق Pcc1 + الفطر *T. harzianum*.
- 13- درنات مغطسة بعالق Pcc1 + البكتريا *A. chroococcum*.
- 14- نباتات ناتجة عن درنات مغطسة بعالق Pcc1 بعمر 10 ايام+ مبيد Beltanol +أوكسيد المغنيسيوم النانوي.
- 15- درنات مغطسة بعالق Pcc1 + مبيد Beltanol + مبيد Goldstone+أوكسيد المغنيسيوم النانوي رشاً بعمر 10 أيام.
- 16- درنات مغطسة بعالق Pcc1 + الفطر *T. harzianum* + أوكسيد المغنيسيوم النانوي رشاً بعمر 10 أيام.
- 17- درنات مغطسة بعالق Pcc1 + *A. chroococcum* +أوكسيد المغنيسيوم النانوي رشاً بعمر 10 أيام.
- 18- درنات مغطسة بعالق Pcc1 + *T. harzianum* + مبيد Beltanol + أوكسيد المغنيسيوم النانوي رشاً بعمر 10 أيام.
- 19- درنات مغطسة بعالق Pcc1 + البكتريا *A. chroococcum* + مبيد Beltanol +أوكسيد المغنيسيوم النانوي رشاً بعمر 10 أيام.
- 20- درنات مغطسة بعالق Pcc1 + الفطر *T. harzianum* + مبيد Goldstone +أوكسيد المغنيسيوم النانوي رشاً بعمر 10 أيام.
- 21- درنات مغطسة بعالق Pcc1 + البكتريا *A. chroococcum* + مبيد Goldstone + أوكسيد المغنيسيوم النانوي رشاً بعمر 10 أيام.
- 22- درنات مغطسة بعالق Pcc1 + البكتريا *A. chroococcum* + الفطر *T. harzianum* + مبيد Beltanol + أوكسيد المغنيسيوم النانوي رشاً بعمر 10 أيام.
- 23- درنات مغطسة بعالق Pcc1 + الفطر *T. harzianum* + البكتريا *A. chroococcum* + مبيد Goldstone + أوكسيد المغنيسيوم النانوي رشاً بعمر 10 أيام.
- نفذت التجربة على وفق التصميم العشوائي الكامل (CRD) Complete Random Design وبواقع 4 مكررات لكل معاملة ، وضعت النباتات في احد البيوت البلاستيكية التابعة لقسم وقاية النبات مع المتابعة اليومية ، سجلت النتائج بعد اربعة اشهر من الزراعة وذلك بحساب:

**1.النسبة المئوية للإصابة Percentage of infection:**

حسبت النسبة المئوية للإصابة حسب المعادلة الآتية:

$$\text{نسبة الإصابة} = \frac{\text{عدد النباتات المصابة}}{\text{عدد النباتات الكلي}} \times 100$$

**2.تقدير فعالية انزيم البيروكسيديز (POD) Peroxidase :**

قدرت فعالية انزيم البيروكسيديز في اوراق نباتات البطاطا بعد 5 ، 10 ايام من الأنبات اذ اتبعت طريقة Hammerschidt وآخرون (1982) لتحديد فعالية الانزيم ،اذ اضيف 2 مل من محلول فوسفات الصوديوم (Sodium Phosphate Buffer) (0.01 M) ذو (PH = 6.5) الى 1 غم من النسيج النباتي على درجة حرارة 4 درجة مئوية وبعد الترشيح من خلال اربع طبقات من القماش وُضع الراشح في جهاز الطرد المركزي على 6000 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة على 4 درجة مئوية، استعمل الطافي كمصدر للانزيم. اخذ 100 مايكروليتر من مستخلص الانزيم مع 1.5 مل من محلول Pyrogallo (0.05 M) في انبوبة جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) ولبدء التفاعل اضيف 100 مايكروليتر من بيروكسيد الهيدروجين 1 % وسجل الامتصاص على طول موجي 420 نانوميتر بجهاز المطياف الضوئي كل 30 ثانية ولعشرة قراءات، حسب مقدار التغير بالامتصاص على وفق المعادلة الآتية :

$$\text{التغير في الامتصاص} = (\Delta A / \Delta T) / \text{غم وزن طري}$$

( التغير في الامتصاص عند 420 نانوميتر/ دقيقة / غم نسيج طري) .

$$\Delta A = \text{التغير بالامتصاص للضوء} \quad \Delta T = \text{التغير بالوقت/ دقيقة.}$$

قيست فعالية الانزيم باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer)

**3. تقدير فعالية الفينول الكلي :**

بعد 5 و10 و15 أيام من الإنبات قدرت نسبة الفينول الكلي في اوراق نباتات البطاطا ، اتبعت طريقة Saikia وآخرون (2004) ، إذ سحق 1 غم من الأوراق مع 10 مل من الميثانول ( تركيز 80% ) في هاون خزفي ثم وضعت في انابيب ووضعت الانابيب في حمام مائي على درجة حرارة 70 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة مع التحريك المستمر بعدها أخذ 250 مايكروليتر من كاشف الفولين مع 5 مل ماء مقطر معقم واضيف الى 1مل من الراشح في انبوبة زجاجية معقمة حُضن المحلول على درجة حرارة 25

درجة مئوية لمدة 30 دقيقة وبعدها قدر الامتصاص بجهاز المطياف الضوئي على طول موجي 725 نانوميتر. حسبت كمية الفينول الكلي على أساس ملي غرام من الفينولات لكل غرام من نسيج نباتي طري.

#### 4.الوزن الطري والجاف للمجموع الخضري:

اخذت 3 نباتات من كل معاملة في نهاية مدة التجربة، إذ قطعت من منطقة التاج ووزنت وسجل الوزن الطري لها، ثم وضعت في فرن كهربائي بعد ان وضعت في اكياس ورقية على درجة حرارة 70 درجة مئوية ولحين ثبات الوزن ثم سجل الوزن الجاف لها.

#### 5.10.3. مؤشرات الحاصل الكمية:

##### 1. عدد درنات النبات القابلة وغير القابلة للتسويق (درنة. نبات-1) :

تم حساب عدد درنات النبات القابلة وغير القابلة للتسويق لنباتات الوحدة التجريبية ثم استخراج المعدل.

##### 2. وزن درنات النبات القابلة وغير القابلة للتسويق (غم. نبات-1) :

تم وزن الحاصل لنباتات الوحدة التجريبية ثم استخراج الحاصل.

#### 11.3. التصميم التجريبي :

نفذت التجارب المختبرية والبيت البلاستيكي على وفق التصميم العشوائي الكامل CRD (Completely Randomized Designe) وتم مقارنة المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي Least Significant Difference (L.S.D) وبمستوى احتمالية 0.05 % (الراوي وخلف الله، 2000) وذلك باستعمال برنامج GenStat الاصدار العاشر.

## رابعاً : النتائج والمناقشة :Results and Discussion

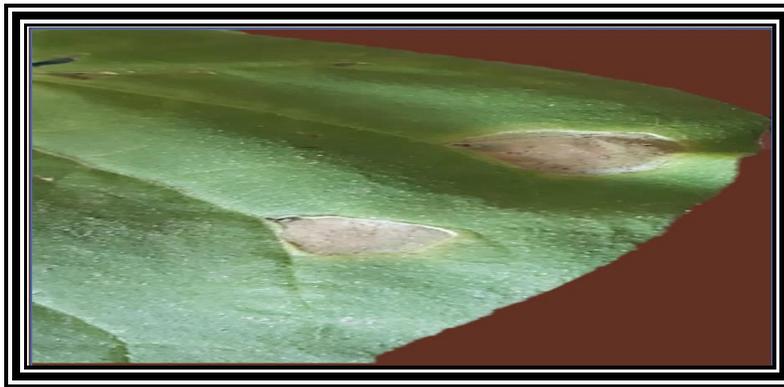
### 1.4. جمع العينات وعزل البكتريا المرافقة للمرض :

لقد تم عزل 15 عزلة بكتيرية مرافقة لمرض التعفن الطري على البطاطا من جميع العينات التي جمعت من مخازن وحقول البطاطا والاسواق المحلية في مناطق مختلفة من محافظتي كربلاء وبابل حيث ظهر النمو البكتيري بعد 12 ساعة على الوسط الزرعي NA وتميزت المستعمرات الفردية بعد 24 ساعة من التحضين في درجة حرارة  $28 \pm 2$  درجة مئوية اذ ظهرت المستعمرات بلون كريمي الى ابيض لامعة ، دائرية، ذات حواف منتظمة وكاملة وسطح محدب وبقطر 0.5-1 ملم ، تشير معظم الدراسات التي تناولت هذا الموضوع الى تطابق هذه الصفات مع الصفات المظهرية للبكتريا *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Holt) وآخرون ، 1994، Schaad ، 2001 و Zhou (2019).

### 2.4. اختبار القدرة الامراضية لعزلات البكتريا المرافقة لمرض التعفن الطري:

#### 1.2.4. اختبار فرط الحساسية على التبغ :Hypersensitive Reaction Test

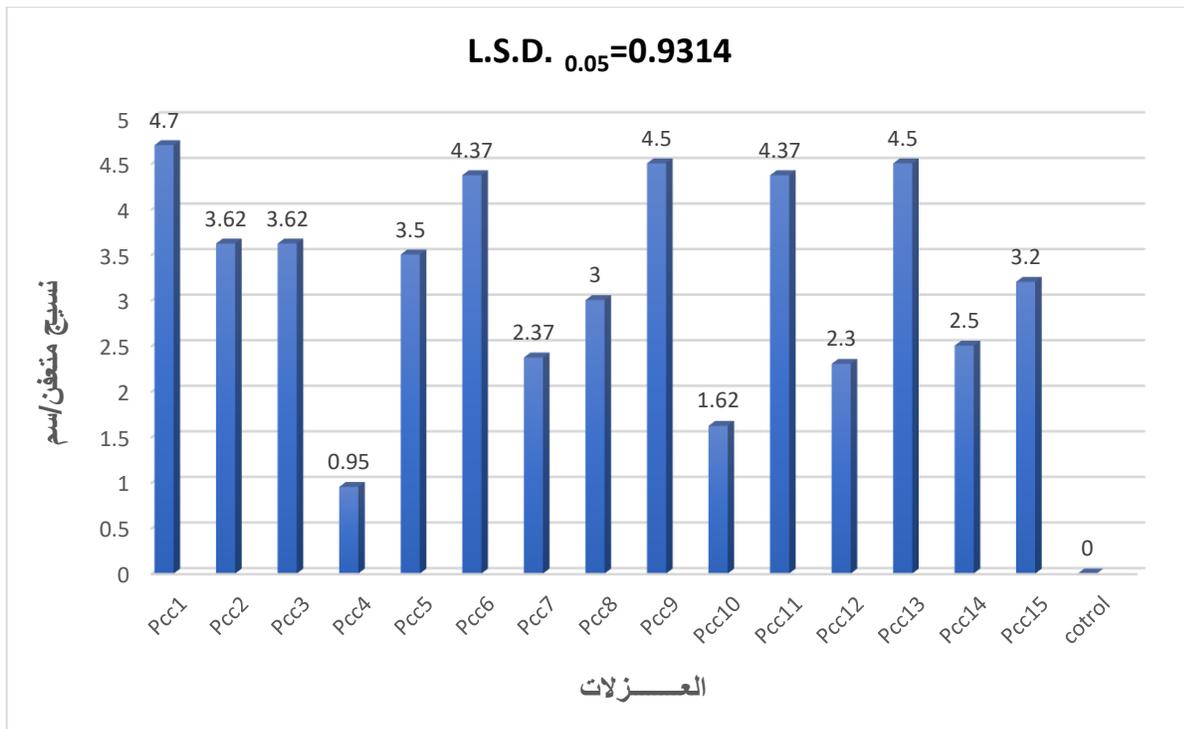
أثبتت نتائج اختبار فرط الحساسية على اوراق نبات التبغ(شكل 1) إن كل العزلات البكتيرية التي تم الحصول من درنات وسيقان البطاطا (جدول 1) كانت قادرة على إحداث المرض ، إذ ظهرت بقع صفراء في المنطقة الملقحة تحولت بعدها إلى اللون البني الفاتح وتفاوتت العزلات البكتيرية فيما بينها في سرعة ظهور هذه الأعراض وتفوقت العزلات Pcc1،Pcc6،Pcc9،Pcc11،Pcc13 على العزلات الأخرى إذ تحولت المنطقة الملقحة إلى اللون الأصفر بعد 10 ساعات من حقن اللقاح البكتيري في الفراغ الخلوي لهذه الأوراق ثم إلى اللون البني بعد 48 ساعة من عملية الحقن ، تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Goszczynska وآخرون (2000) و Zhou (2019) .



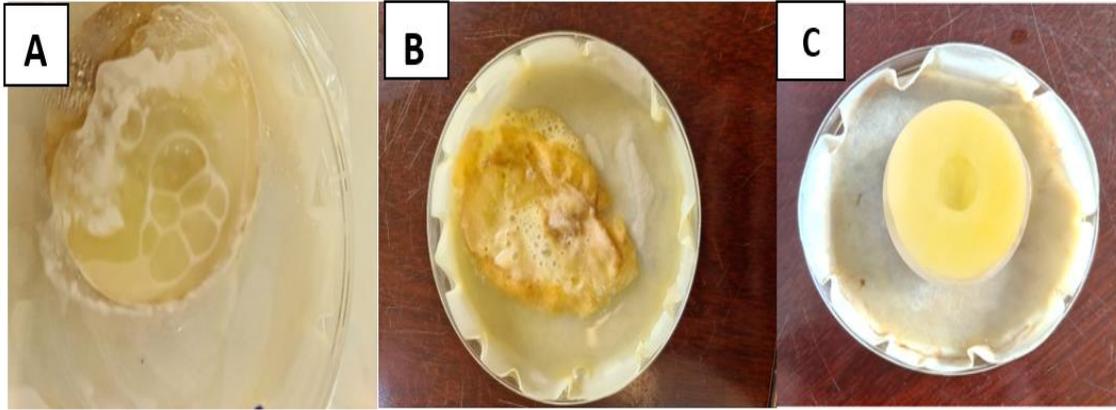
شكل 1. اختبار فرط الحساسية على أوراق النبات التبغ المتسبب عن البكتريا *P. carotovorum*

## 2.2.4. اختبار الأمراض على شرائح البطاطا:

اظهرت نتائج اختبار القدرة الامراضية على شرائح البطاطا (شكل 2 و 3) ان جميع العزلات البكتيرية المدروسة (جدول 2) لها القدرة على احداث مرض التعفن على شرائح البطاطا و ظهور اعراض مميزة اهمها تحلل الانسجة وانبعاث روائح كريهة بسبب نشاط البكتريا وتفاوتت العزلات البكتيرية فيما بينها في مساحة الضرر على شرائح البطاطا من خلال سرعة ظهور الاعراض اذ تراوح الضرر بين 0.95 - 4.70 سم (شكل 2)، وتفاوتت العزلة Pcc1 على جميع العزلة في حجم النسيج المتضرر وسرعة ظهور الاعراض اذ بلغ مساحة النسيج المتضرر 4.70 سم خلال 72 ساعة تلتها العزلات Pcc6، Pcc9، Pcc11 و Pcc13، بمساحة نسيج متضرر بلغ 4.37، 4.50، 4.37 و 4.50 سم على التوالي خلال 72 ساعة اما اقل عزلة فكانت Pcc4 و بحجم نسيج متضرر بلغ 0.95 سم. و بناءا على نتائج الفقرتين 1.3.4 و 2.3.4 فقد اختيرت العزلات الخمسة لأجراء اختبارات التشخيص عليها و العزلة Pcc1 لغرض تشخيصها جزئياً.



شكل 2 : اختبار القدرة الامراضية لعزلات البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري على شرائح درنات البطاطا



شكل 3. امراضية العزلة البكتيرية Pcc1 على شرائح درنات البطاطا إذ إن:  
(A) الامراضية بعد 3 ايام ، (B) تطور الامراضية بعد 6 ايام (C) معاملة المقارنة (ماء مقطر معقم فقط)

#### 3.4. تشخيص البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري:

##### 1.3.4. الصفات المظهرية والمجهرية لعزلات البكتريا قيد الدراسة:

يوضح الجدول (7) النتائج التي تم الحصول عليها من دراسة الصفات المظهرية و المجهرية للبكتريا المعزولة من درنات وسيقان البطاطا المصابة بمرض التعفن الطري على البطاطا:

#### جدول (7) الصفات المظهرية والمظهرية للبكتريا قيد الدراسة

الملاحظات	الصفة
سالب	التفاعل مع صبغة كرام
عصوي قصير	شكل الخلايا
غالبيتها مفردة وبعضها متجمعة	تجمع الخلايا
كريمي الى ابيض لامع ، دائرية، ذات حواف منتظمة وكاملة ، محدبة وبقطر 0.5-1 ملم	لون المستعمرات وشكلها على وسط NA

تتفق هذه النتائج مع خصائص البكتريا *P. carotovorum* المذكورة في Holt وآخرون (1994) و Schaad (2001) و Perombelon (2006) و Gallelli وآخرون، (2009) و Oulghazi وآخرون (2021).

## 2.3.4. قابلية النمو في بعض الاوساط الزرعية التفريقية:

يبين الجدول (8) طبيعة نمو العزلات البكتيرية قيد الدراسة وصفات المستعمرات النامية على بعض الاوساط الانتخابية والتفريقية

جدول (8) طبيعة نمو العزلات البكتيرية قيد الدراسة في بعض الاوساط الزرعية الانتخابية والتفريقية

الملاحظات	الوسط الزراعي
مستعمرات صفراء الى كريمة ، محدبة، لامعة، دائرية ذات حافة كاملة	طبيعة النمو على وسط YDC
مستعمرات بيضاء الى كريمة، محدبة، دائرية	طبيعة النمو على وسط D- 3 Agar
مستعمرات بيضاء الى كريمة – حافة كاملة – مستديرة محدبة ، غير شفافة	طبيعة النمو على وسط Kings Medium (KB)
مستعمرات كريمة، دائرية، منتظمة، محدبة	طبيعة النمو في وسط البكتات وكريستيل فايوليت (CVP)

تتفق هذه النتائج مع نتائج دراسات سابقة عن نمو البكتريا *Pectobacterum carotovorum* في بعض الاوساط التفريقية والانتخابية Holt و Krieg ، (1984) و Holt واخرون ، (1994) و Terta واخرون، (2010) و Baghaee -Ravari واخرون، (2011).

## 3.3.4. الاختبارات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة:

يظهر الجدول (9) مجمل نتائج الاختبارات البايوكيميائية التي تم الحصول عليها للعزلات البكتيرية قيد الدراسة والمرافقة للإصابة بمرض التعفن الطري على البطاطا .

جدول (9) نتائج الاختبارات البايوكيميائية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة.

النتائج	الاختبارات البايوكيميائية	ت
+	الكاتاليز	1
-	الأوكسيديز	2
-	احمر المثل	3
-	Voges-Proskauer	4
-	Phynelalanen	5
-	تحلل النشأ	6
+	تميع الجيلاتين	7
+	النمو في وسط Nutrient broth	8
+	النمو في درجة حرارة 35 م	9
+	النمو في وسط حاوي على 5% كلوريد الصوديوم	10

- (+) نتيجة موجبة للاختبار

- (-) نتيجة سالبة للاختبار

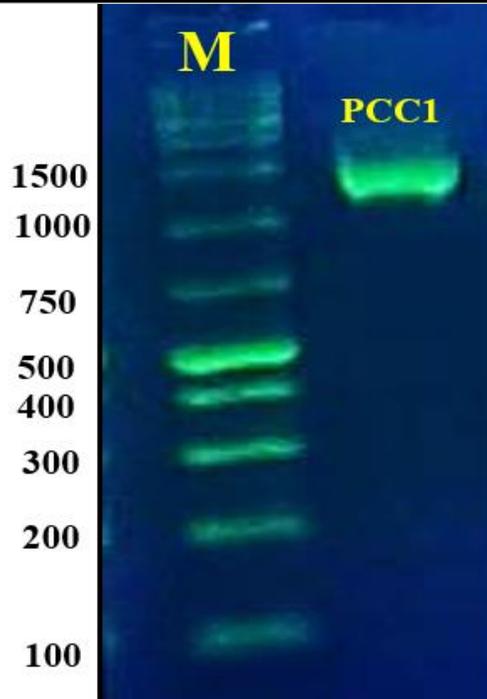
تطابقت هذه النتائج مع ما توصل اليه رمضان والمشهداني (2006), Selman و Mohammed

(2013) و Gasic وآخرون (2014).

#### 4.4. التشخيص الجزيئي للعزلة البكتيرية *Pectobacterium carotovorum* subsp.

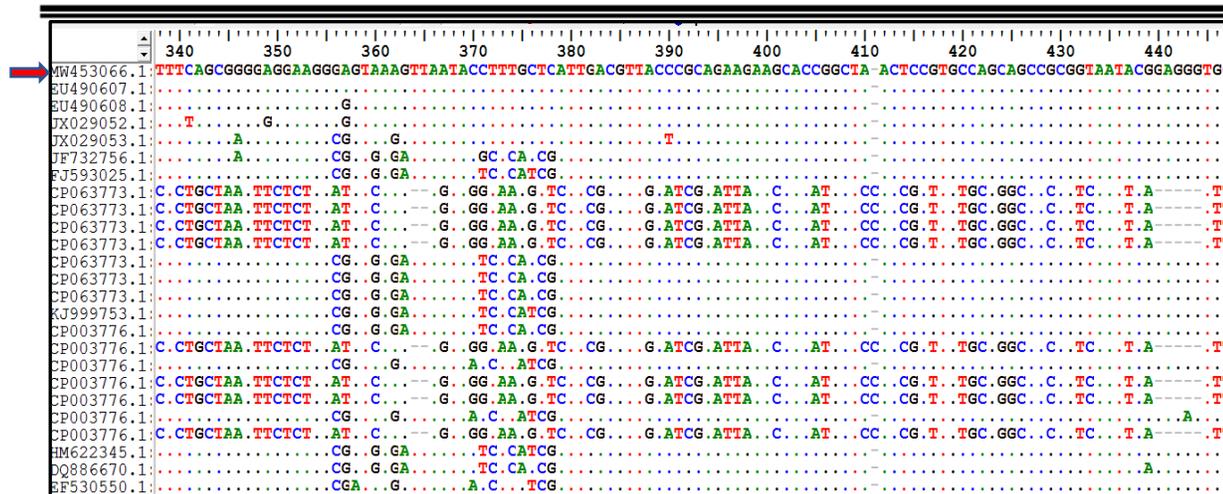
*Pcc1 carotovorum* باستعمال تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وتحديد التسلسل القواعد النيتروجينية:

اثبتت نتائج استخلاص الحامض النووي (DNA) من عزلة البكتريا Pcc1 المعزولة في هذه الدراسة من درنات البطاطا المصابة و تضخيمه بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR amplification) إمكانية الحصول على ناتج مضاعفة الحامض النووي (PCR-amplified products) الخاص بالبكتريا بحجم 1500 زوج قاعدة نيتروجينية بوجود البادئان 27F و 1492R (Universal PCR primers) (شكل 4).

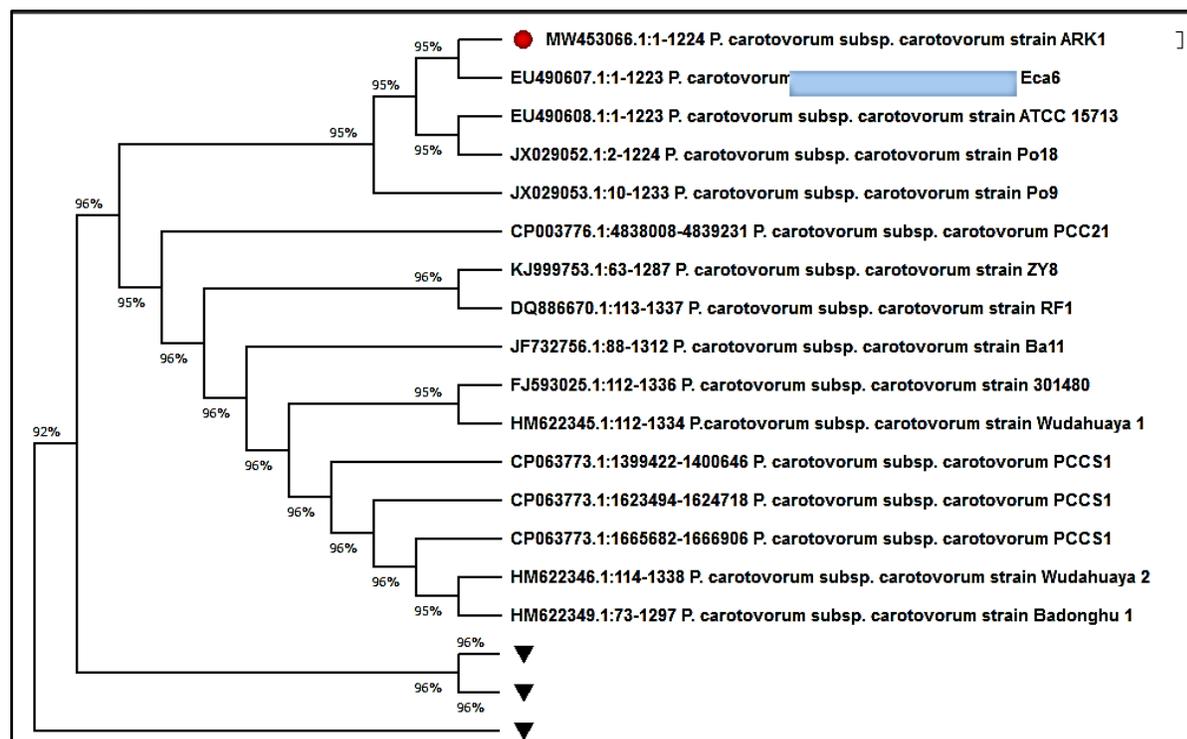


**شكل 4:** ناتج الحامض النووي (PCR products) المضاعف باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من البكتريا المعزولة في هذه الدراسة من درنات البطاطا المصابة. M = سلم الحامض النووي (100bp molecular-weight size marker) بأحجام مثبت كل منها بعدد ازواج القواعد النيتروجينية (bp) على الجانب الايسر من الشكل.

اثبتت تحليل تسلسل القواعد النيتروجينية (Nucleotide sequence analysis) (ملحق 1) لناتج الحامض النووي المضاعف من البكتريا المعزولة في هذه الدراسة و باستخدام برنامج BLAST إن هذه العزلة هي عائدة للنوع *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. كما وجد من خلال مقارنة تسلسل القواعد النيتروجينية للمنطقة الجينية المستهدفة (16S rRNA) في هذه العزلة مع العزلات الاخرى للبكتريا (*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*) المسجلة سابقا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن هناك تشابه وراثي كبير مع عزلة البكتريا المشخصة في هذه الدراسة (شكل 5). اظهرت شجرة التحليل الوراثي (Neighbor-Joining tree) ظهور عزلة الدراسة في تفرع منفصل مع عزلة البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (EU490607) المسجلة في المركز المذكور (NCBI) و بنسبة تشابه بينهما بلغت 95%.



شكل 5: بعض مواقع التشابه و الاختلاف بين تسلسل القواعد النيتروجينية لعزلة البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* المشخصة في هذه الدراسة و تسلسلات القواعد النيتروجينية لنفس المنطقة الجينية (16S rRNA) لعزلات نفس البكتريا (*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*) المسجلة سابقا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).



شكل 6: شجرة التحليل الوراثي (Phylogenetic tree) تبين العلاقة الوراثية بين البكتريا *P. carotovorum* المعزولة في هذه الدراسة (المؤشرة بالدائرة الحمراء) مع العزلات الاخرى العائدة لنفس النوع و المسجلة سابقا في المركز الوطني الأمريكي لمعلومات التقنية الحيوية NCBI.

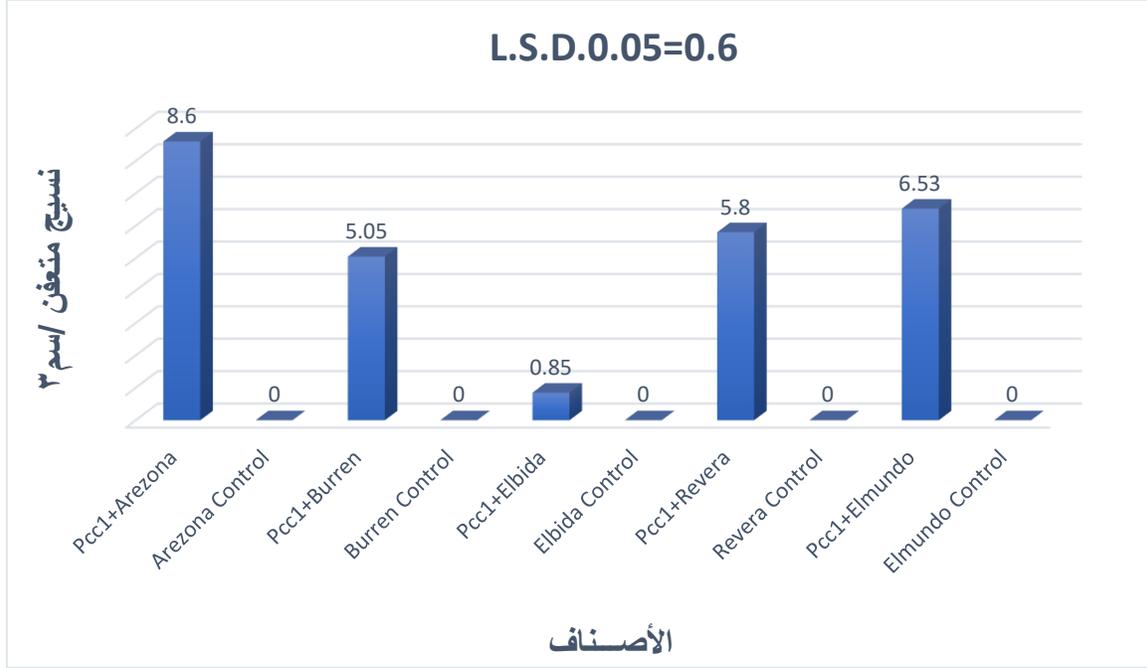
يستنتج مما تقدم بان عزلة البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* المعزولة و المشخصة في هذه الدراسة كانت مختلفة وراثيا عن العزلات الاخرى المشخصة سابقا في بلدان مختلفة و المسجلة في المركز في المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية (NCBI)، لذا تم تسجيل هذه العزلة في المركز المذكور و تحت رقم الادخال (Accession number) MW453066.

وأشارت أبحاث سابقة بأن تشخيص الأنواع البكتيرية بالاعتماد على الصفات المظهرية (Morphological characters) يعطي أحيانا نتائج خاطئة لعملية التشخيص، لهذا استخدمت في هذه الدراسة تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و تسلسل القواعد النروجينية في تشخيص البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* العزلة Pcc1 وقد استعملت تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) في دراسات سابقة لدقتها العالية في تشخيص العديد من الكائنات الحية و منها البكتريا مثل البكتريا *Pseudomonas fuscovaginae*، و *Xanthomonas oryzae* و *Candidatus asiaticus* و *Clavibacter michiganensis* و *Pseudomonas marginalis* و *Pseudomonas grimontii* و *subsp. Michiganensis* و *Pseudomonas syringae* و *Xanthomonas* spp. (Sawada) و آخرون ، 2020 و Peñázová و آخرون ، 2020 و Sarjono و آخرون ، 2020 و Bangratz و آخرون ، 2020 و Cellier و آخرون ، 2020) للتخلص من مشاكل التشخيص المعتمدة على الصفات المظهرية (Morphological characters). على الرغم من فائدة التشخيص المظهري في حصر البكتريا قيد البحث في مجاميع اصغر قبل الشروع باستخدام طرائق أخرى في التشخيص فإن هناك العديد من المشاكل التي تصاحب التشخيص المظهري للبكتريا منها حاجة القائم بعملية التشخيص إلى خبرة عالية خاصة في الأنواع البكتيرية القريبة التشابه فيما بينها فضلا عن احتياجها إلى وقت و جهد كبيرين (Tumbariski و آخرون ، 2020 و Cui و آخرون ، 2020). كما إن هناك بعض العوامل الأخرى التي تؤثر على تلك الصفات المظهرية ومنها نوع النمو وطبيعته ووسطه والرطوبة والإضاءة التي من الممكن إن تؤثر على لون المستعمرات البكتيرية النامية وأشكالها.

#### 5.4 حساسية اصناف البطاطا لعزلة البكتريا *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc1) ومحتوى الاصناف من المادة الجافة و النشا وعنصر الكالسيوم:

اظهرت النتائج (شكل 7) تفوق الصنف Arezona معنويا على الاصناف الاخرى في حساسيته للإصابة بالبكتريا *P. carotovorum carotovorum* المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا اذ ظهر اشد الاصناف حساسية وبجسم نسيج متعفن بلغ 8.60 سم<sup>3</sup> تلاه الصنف Elmundo والذي بلغ حجم النسيج

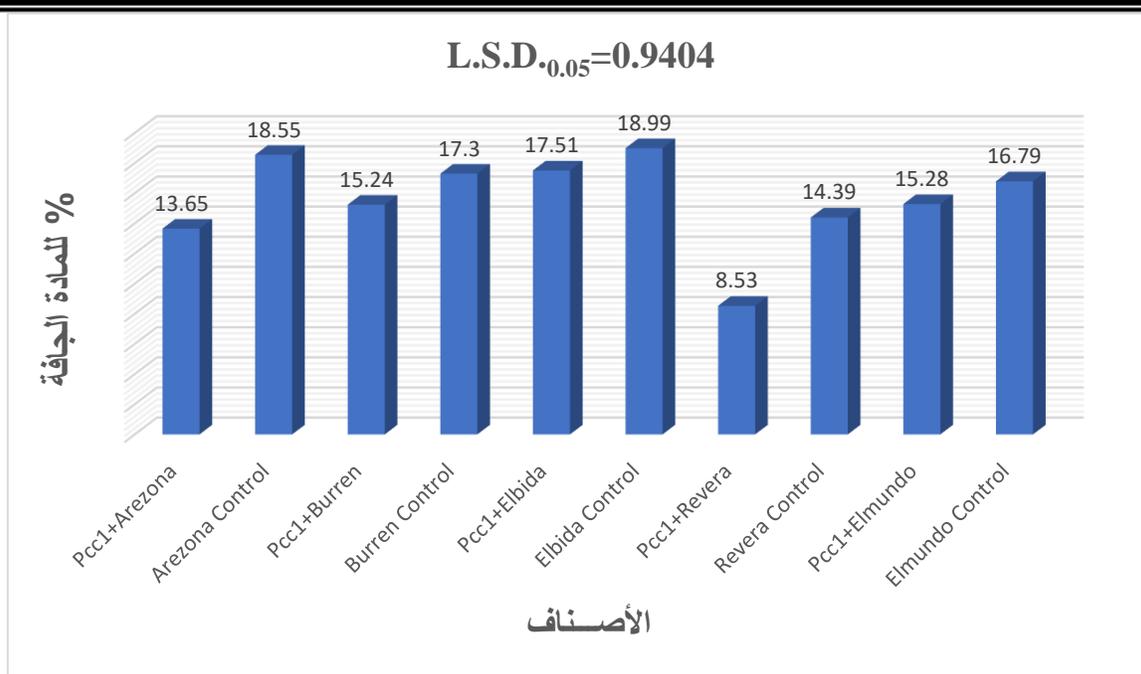
المتعفن فيه 6.53 سم<sup>3</sup> اما الاصناف Burren،Revera فقد بلغ حجم النسيج المتعفن فيهما 5.80،5.05 سم<sup>3</sup> على التوالي في كان اقل الاصناف حساسية هو الصنف Elbida وبحجم نسيج متعفن بلغ 0.85 واختلفت جميع هذه الاصناف عن بعضها معنويا .



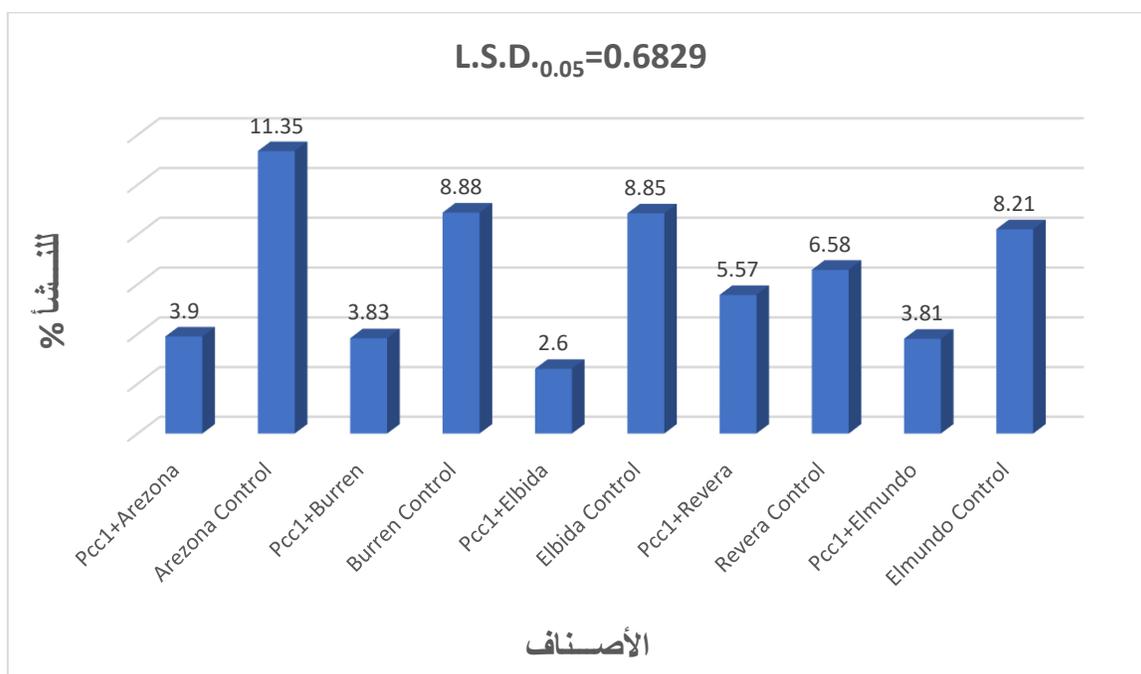
شكل 7. حجم النسيج المتعفن الناتج عن اصابة عدد من اصناف البطاطا للإصابة بالبكتريا

*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*

واظهرت النتائج ايضا(شكل 8) تفوق الصنف Elbida عن الاصناف الاخرى معنويا اذ بلغت النسبة المئوية للمادة الجافة 17.51 اما الصنف Revera فكان اقل الاصناف في النسبة المئوية للمادة الجافة وكانت 8.53 وتدرجت باقي الاصناف بينهما اذ بلغت 15.28، 15.24، 13.65، غم على التوالي للاصناف Arezona، Burren، Elmundo واختلفت جميع الاصناف معنويا عن معاملة المقارنة السليمة والتي بلغت النسبة المئوية للمادة الجافة فيها 20.20 غم .



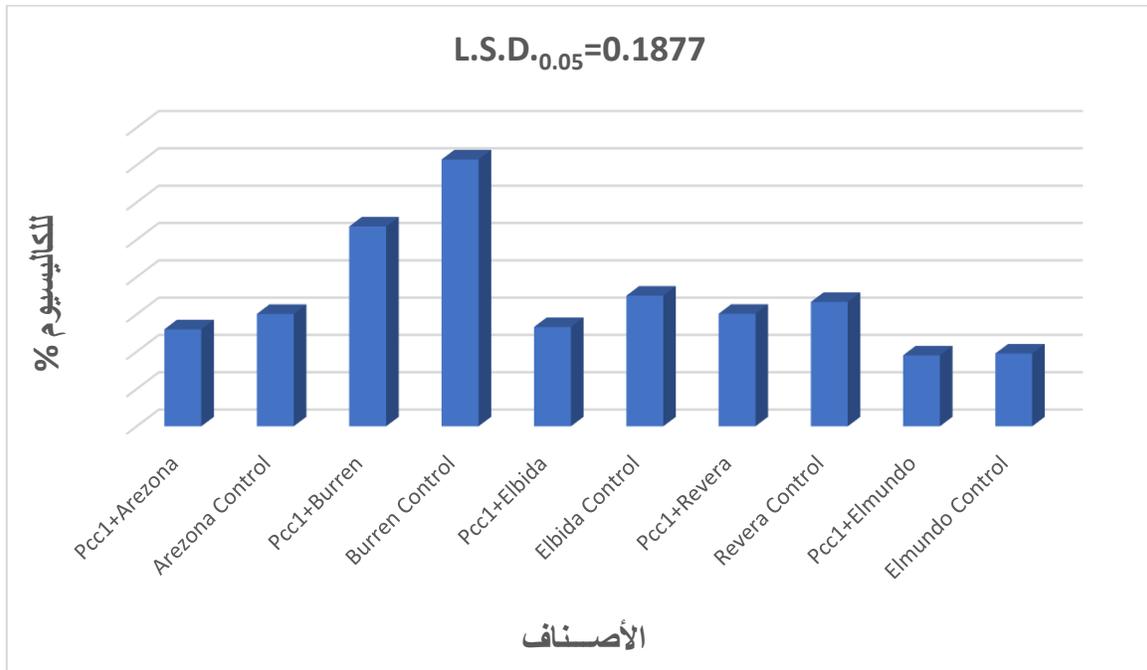
شكل 8. تأثير إصابة عدد من اصناف البطاطا بالبكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* في النسبة المئوية للمادة الجافة



شكل 9. تأثير إصابة عدد من اصناف البطاطا بالبكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* في النسبة المئوية للنسبة المئوية للمادة الجافة

في حين تفوق الصنف *Revera* (شكل 9) على الاصناف الاخرى معنوياً في النسبة المئوية للنشأ إذ بلغت 5.57 وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة والتي بلغت 6.27 في حين كان الصنف *Elbida* اقل الاصناف في النسبة المئوية للنشأ وبلغت 2.60 اما الاصناف *Arezona*، *Burren*، *Elmundo*، فكانت النسبة المئوية للنشأ فيها على التوالي 3.90، 3.83، 3.81.

واظهرت النتائج (شكل 10) تفوق الصنف *Burren* معنوياً على الاصناف الاخرى في النسبة المئوية لمحتوى الكالسيوم والتي بلغت 1.07 متفوقاً على جميع المعاملات وضمنها معاملة المقارنة والتي بلغت النسبة فيها 0.73 وبلغت النسبة في الاصناف *Arezona*، *Elbida*، *Revera*، *Elmundo* على التوالي 0.52، 0.53، 0.60، 0.38.



شكل 10. تأثير اصابة عدد من اصناف البطاطا بالبكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* في النسبة المئوية للكالسيوم

من خلال النتائج المتحصل عليها تبين ان هناك علاقة غير واضحة بين محتوى الاصناف من المادة الجافة وحساسيتها للاصابة بمرض التعفن الطري، وقد يكون لهذه العلاقة تأثيراً في حساسية الاصناف للاصابة بهذا المرض، فقد تكون الاصناف الحاوية على نسبة اعلى من المادة الجافة اقل عرضه للاصابة بمرض التعفن الطري. و يتضح من النتائج المبينة انه ليس هناك علاقة ثابتة بين محتوى درنات اصناف البطاطا من عنصر الكالسيوم وحساسيتها للاصابة بمسبب مرض التعفن الطري شكل ( 7 ). وجاءت هذه النتائج متفقة مع ما ذكره بعض الباحثين فقد اشار Lebecka وآخرون (2021) الى عدم وجود علاقة ثابتة بين محتوى الكالسيوم في الانسجة وحساسية الاصناف لمرض التعفن الطري، ولاحظوا وجود علاقة عالية بين محتوى جدران الخلايا ومستوى المقاومة. ذكر Gumede (2017) ان مكونات جدران الخلايا تشكل حوالي 5 – 10 % من وزن المادة الجافة للدرنة وقد يكون لذلك بعض التأثير على العلاقة بين المادة الجافة وحساسية الاصناف لمرض التعفن الطري، و اشار مرزة (2019) الى ان الدرنات ذات المحتوى العالي من الكالسيوم والمادة الجافة من المرجح ان تكون اقل عرضة للتعفن الطري البكتيري من الدرنات ذات النسب المئوية المنخفضة منها، و ذكر Bethke وآخرون (2019) ان كل صنف يحتوي على عوامل وراثية مختلفة تؤثر على مقاومة مرض التعفن الطري تتضمن (Electrolyte composition) ، نفاذية الغشاء (Membrane permeability)، انخفاض مستوى السكريات (Reducing sugar levels)، ومحتوى المادة الجافة (Dry matter content) ومستويات الكالسيوم (Calcium levels) وبناءً على النتائج المبين في الشكل ( 7 ) فقد تم اختيار الصنف Arezona لاكمال التجارب اللاحقة لكونه اكثر صنف حساس للاصابة بالكتريا الممرضة .

#### 6.4. اختبار المدى العائلي للبكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* (Pcc1) المسببة التعفن الطري على البطاطا:

اظهرت النتائج (جدول 10) ان العزلة Pcc1 العائدة للبكتريا *P. carotovorum carotovorum* والمعزولة في هذه الدراسة من نباتات البطاطا المصابة بمرض التعفن الطري لها القدرة على اصابة جميع النباتات المختبرة في هذه الدراسة وبدرجات متفاوتة، وقد تفوقت معنوياً في اصابتها لشرائح نبات البطاطا وبقطر منطقة تعفن بلغ 4.69 سم تلاها معدل قطر منطقة التعفن في شرائح القرع والتي بلغت 2.66 سم اما اقل معدل لقطر منطقة التعفن فكان في شرائح الباذنجان وبلغ 0.23 سم والذي لم يختلف معنوياً عن معدل قطر منطقة التثبيط في شرائح الشلغم والشمندر والبصل والفجل والتي بلغت على التوالي 0.26، 0.93،

0.60 0.26 سم واختلفت جميع هذه المعاملات معنويا عن معدل قطر منطقة التثبيط في شرائح البروكلي والخيار والجزر والذي بلغ 1.66، 1.66، 1.33 سم على التوالي.

جدول (10) اختبار المدى العائلي للبكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc1) المسببة التعفن الطري على البطاطا.

نوع النبات	control	قطر منطقة التعفن/سم
البطاطا	0	4.69
الباذنجان	0	0.23
الشلغم	0	0.26
الشمندر	0	0.93
القرع	0	2.66
الخيار	0	1.66
الفجل	0	0.26
الجزر	0	1.33
L.S.D.0.05	-	0.7365

- كل رقم في الجدول يمثل معدل لاربعة مكررات

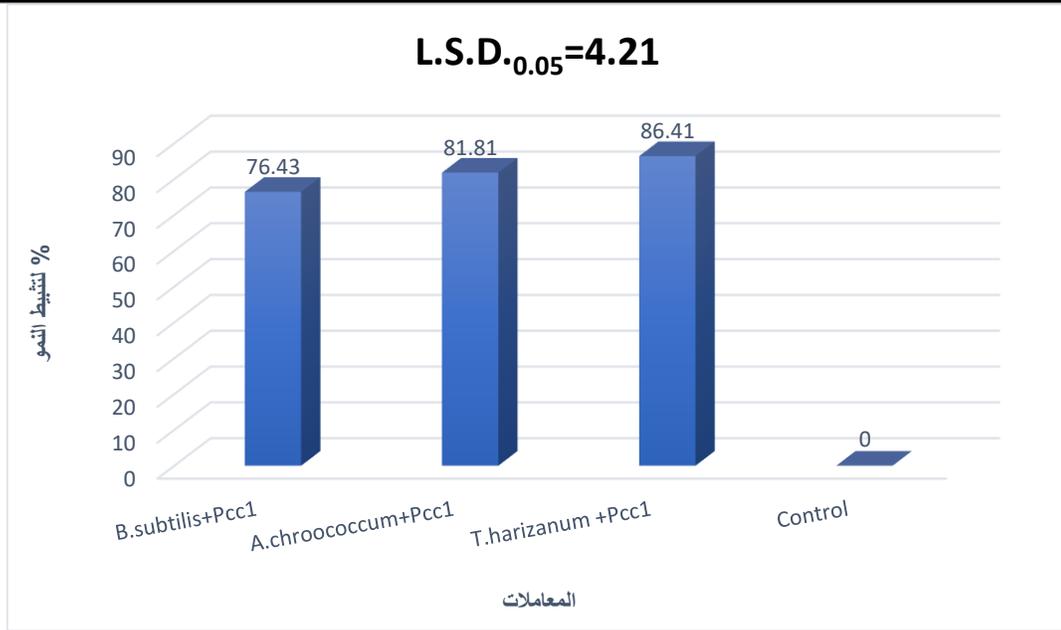
تتفق هذه النتائج مع ما ذكره Aizawa وآخرون (2014) و Oztruk وآخرون (2018) من امتلاك البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc1) مدى عائلي واسع جدا إذ تصيب نباتات كثيرة مثل البطاطا، الجزر، الكرفس، الخيار، الموز، الطماطة، الفلفل، الفاصولياء، اللهانة، الكسافا، القهوة، الذرة، القطن، البصل و البطاطا الحلوة كما تهاجم الاجزاء الخازنة للمواد الغذائية كالدرنات والابصال والكورمات و الريزومات والسيقان العصارية للنباتات، كما تتفق مع ما ذكر Li وآخرون، (2019) ان بكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* لها القدرة على إصابة مدى واسع من النباتات عن طريق الجروح وتعد من الأمراض المهمة اقتصاديا وتصيب مختلف العوائل النباتية.

7.4. مكافحة البكتريا (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا:

1.7.4. إختبار القدرة التضادية للبكتريا *B.subtilis* و *A.chroococcum* والفطر *T.harzianum* ضد البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط الزراعي NA:

أظهرت نتائج هذه التجربة (شكل 11) فعالية جميع العوامل الأحيائية المستعملة وهي *B.subtilis*، *A.chroococcum* و *T.harzianum* إذ أظهرت هذه العوامل كفاءة عالية في تثبيط نمو البكتريا الممرضة *P. carotovorum carotovorum* قياساً بمعاملة المقارنة وقد تفوق المقاوم الأحيائي *T.harzianum* في تثبيط البكتريا الممرضة حيث بلغت النسبة المئوية لتثبيط الممرض 86.41% تلتها وبفارق معنوي البكتريا *A.chroococcum* والتي بلغت نسبة تثبيطها للممرض 81.81% أما أقل نسبة تثبيط فكانت في معاملة البكتريا *B.subtilis* مع الممرض إذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط فيها 76.43%.

وقد تعزى كفاءة المقاوم الأحيائي *T.harzianum* في تثبيط البكتريا الممرضة *P. carotovorum* إلى إنتاج العديد من الإنزيمات التي تعمل على تحلل الجدار الخلوي للمسببات المرضية وبالتالي تحطيم جدران الخلايا وبدء عملية الاستعمار والتطفل على المسبب المرضي مثل إنزيم الـ Protease و Esterase و Phosphamidase فضلا عن إنتاجه لعدد كبير من المضادات الحيوية والتي من أهمها Trichorzianines، Acetaldehyde، Alamethicine، Dermadine التي تثبط عمل بعض من إنزيمات المسبب المرضي وبالتالي العمل على إيقاف دورة المرض منذ البداية، وقد يعزى تأثير البكتريا *A.chroococcum* في الممرض لإفرازها عدد من المضادات الحيوية والإنزيمات المحللة لجدران الخلايا مثل Endochitinase و Zarrin chitobiosidase و تتفق هذه النتائج مع النتائج التي توصل اليه مرزة (2019) و الخفاجي (2020) و Abd-Elkhair (2021).



شكل 11. القدرة التضادية للبكتريا *B.subtilis* و *A.chroococcum* والفطر *T.harizianum* ضد البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط الزراعي NA

2.7.4. إختبار القدرة التضادية للبكتريا *B.subtilis* و *A.chroococcum* والفطر *T.harizianum* ضد البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على شرائح البطاطا مختبريا:

اظهرت النتائج (جدول 11) تفوق الفطر *T. harzianum* معنويا على عوامل التضاد الاخرى في تثبيته للبكتريا *P.carotovorum* subsp. *carotovorum* اذ بلغ قطر النسيج المتعفن 0.82 سم والنسبة المئوية للتثبيط 81.77% قياسا بمعاملة الفطر الممرض فقط والتي بلغ قطر النسيج المتعفن المتعفن فيها 4.50 سم تلتها معاملة البكتريا *A. chroococcum* والتي لم تختلف عنها معنويا اذ بلغ قطر النسيج المتعفن فيها 1.17 والنسبة المئوية للتثبيط 74.0%.

جدول (11) القدرة التضادية للبكتريا *B.subtilis* و *A.chroococcum* والفطر *T.harzianum* ضد البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على شرائح البطاطا مختبريا.

النسبة المئوية للتثبيط	قطر النسيج المتعفن (سم)	المعاملة
44.44	2.50	<i>Bacillus subtilis</i> + Pcc1
74.0	1.17	<i>Azotobacter chroococcum</i> + Pcc1
81.77	0.82	<i>Trichoderma harzianum</i> + Pcc1
0.00	4.50	Control
11.457	0.5156	L.S.D. 0.05

- كل رقم في الجدول يمثل معدل لعشرة مكررات

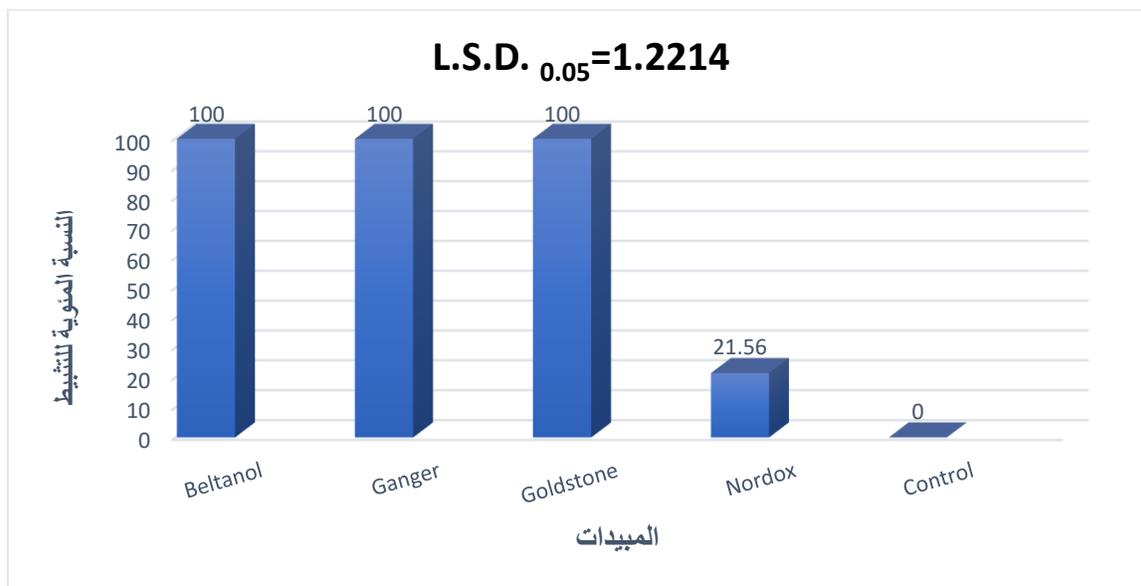
في حين كانت اقل المعاملات تأثيرا في نمو الممرض هو العامل الاحيائي *B. subtilis* اذ بلغ قطر النسيج المتعفن 2.50 وبنسبة تثبيط 44.44% وقد يعزى فاعلية الفطر *T. harzianum* في البكتريا الممرضة الى امتلاكه عدة اليات للتضاد منها التطفل والمنافسة على الغذاء والمكان فضلا عن سرعة نموه العالية وطاقته التكاثرية الكبيرة يضاف لذلك قدرته على تكوين عدد من المضادات الحيوية منها Trichorzianines ، Acetaldehyde ، Alkamethicine ، Dermadine ، Alkylpyrones ، chitinases و  $\beta$ -13 glucanases. وقد يعزى تأثير البكتريا *A. chroococcum* في الممرض لافرازها عدد من المضادات الحيوية والانزيمات المحللة لجدران الخلايا مثل Endochitinase و Zarrin chitobiosidase تتفق هذه النتائج مع النتائج التي توصل اليه مرزة (2019) و الخفاجي (2020) و Abd-Elkhair (2021).

3.7.4. تقييم كفاءة المبيدات الكيميائية Nordox، Goldstone، Ganger، Beltanol في البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط NA:

اظهرت النتائج (شكل 12) تمكن جميع المبيدات الكيميائية المستخدمة في هذه التجربة تثبيط البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة اذ بلغت النسبة المئوية لتثبيط البكتريا الممرضة 100% عند استخدام المبيدات Goldstone، Ganger، Beltanol قياسا بمعاملة المقارنة والتي بلغت النسبة المئوية للتثبيط فيها 0.00% اما المبيد الكيميائي Nordox فقد ثبت البكتريا الممرضة وبنسبة مئوية بلغت 21.56%.

قد يعزى تأثير المبيدين Beltanol و Ganger الى المادة الفعالة لكلاهما هي (hydroxyquinoline sulphate 50% w/v) والتي اثبتت فاعلية عالية في مكافحة عدد كبير من مسببات الامراض النباتية الفطرية والبكتيرية وجاءت هذه النتيجة متوافقة مع نتائج دراسات سابقة من خلال تثبيط نمو المسببات المرضية بشكل كامل (العيساوي ، 2006 ، الجنابي ، 2008 و جعفر ، 2012) .

ربما يعزى سبب تثبيط النمو البكتيري بفعل المبيد Goldston لاحتوائه على أوكسيد النحاس (يمثل النحاس 60% من تركيب المبيد) وبالتالي فهو يمنع تكاثر البكتريا وفي اغلب الأحيان يتسبب في موت أعداد كبيرة من البكتريا نتيجة لتأثير أيون النحاس ثنائي التكافؤ السام ، اذ تعمل أيونات النحاس بشكل غير محدد (متعدد المواقع) على مستوى غشاء الخلية ، مما يؤدي إلى التأثير على البروتينات الهيكلية والإنزيمية وتغيير نفاذية الغشاء و يمكن أن تدخل أيونات النحاس الذائبة إلى بروتوبلازم الخلية وعند دخولها تتداخل مع العديد من التفاعلات الأنزيمية (Steck و Grey ، 2001 و Ordax وآخرون ، 2005 و Aguirre و Pilon ، 2016 والخفاجي ، 2020). أظهرت المعالجة بالمركبات النحاسية كفاءة جيدة في مكافحة أنواع مختلفة من البكتريا التي تصيب أمراض النبات وبناءً على نتائج هذه التجربة فقد اختير المبيد Beltanol و Goldston لاستخدامهما في التجارب اللاحقة.



شكل 12. تقييم كفاءة المبيدات الكيميائية Beltanol ، Ganger ، Goldstone و Nordox في البكتريا *subsp. P. carotovorum carotovorum* (Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط NA

#### 4.7.4. تأثير المبيدين الكيميائيين Goldstone و Beltanol في نمو عزلات الفطر *T.harzianum* و البكتريا *A.chroococcum* مختبرياً.

اظهرت النتائج (جدول 12) عدم وجود فروق معنوية بين التراكيز الموصى بها والتراكيز الاقل للمبيدين Goldstone و Beltanol المستخدمة في هذه التجربة في تأثيرها التضادي على عوامل المقاومة الاحيائية *T.harzianum* و *A.chroococcum* اذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط لكلاهما عند استخدام التركيز الموصى به (1.00 مل/لتر) من مبيد Beltanol 4.7 % ، 5.3 % على التوالي ولم تختلف هذه النسب معنوياً عند استخدام اقل من التركيز الموصى به (0.75 مل/لتر) اذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط 4.5 ، 5.1 على التوالي، في حين بلغت النسبة المئوية للتثبيط 3.2 % ، 4.4 % على التوالي عند استخدام التركيز الموصى به (2.00 غم/لتر) من المبيد Goldstone ولم تختلف هذه النسب معنوياً عند استخدام التركيز الاقل من هذا المبيد (1.5 غم/لتر) اذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط 3.00 % ، 4.3 % على التوالي للفطر *T.harzianum* و البكتريا *A.chroococcum* وبالتالي امكانية استخدام التكامل بين المبيدات الكيميائية بالتراكيز الموصى بها وعوامل مكافحة الاحيائية في تجارب مكافحة في نفس الوقت .

#### جدول (12). تأثير المبيدين الكيميائيين Goldstone و Beltanol في نمو عزلات الفطر *T.harzianum* و البكتريا *A.chroococcum* مختبرياً

% التثبيط						المبيدات العزلات
Goldstone			Beltanol			
المعدل	2.00 غم/لتر	1.5 غم/لتر	1.00 مل/لتر	0.75 مل/لتر	Control	
3.85	3.2	3.00	4.7	4.5	0.00	<i>T.harzianum</i>
4.775	4.4	4.3	5.3	5.1	0.00	<i>A.chroococcum</i>
-	3.8	3.65	5.00	4.8	0.00	المعدل
0.032 للمبيد		0.130 للعزلات		0.225 للتركيز		L.S.D. 0.05

- كل رقم في الجدول يمثل معدل لثلاث مكررات

ويعزى عدم تأثر الفطر *T.harzianum* بالمبيدين Goldstone و Beltanol الى قدرته على تحمل (Tolerant) او مقاومة (Resistance) فعل المبيدات وهذا يتفق مع ما ذكره Alwan و Sukkar (2010) و اللوباي و اخرون (2018) ان الفطر يقوم بإفراز أنزيمات (Enzymes) خاصة بأبيض المبيدات تؤدي عملها بطريقتين مترابطتين يتم في الأولى تغير التركيب الجزيئي للمبيد ليصبح اقل سمية من المادة الاصلية أما في الثانية فيتم تحويل التركيب الجزيئي إلى مركب أكثر قطبية و عندها يصبح أكثر ذوباناً في الماء ويمكن التخلص منه إلى خارج الجسم ، حيث تكون معظم المبيدات الكيميائية غير ذائبة في الماء

ونتيجة أكسدتها أو تحللها مائياً يساعد على إدخال مجاميع قطبية إلى الجزئي ليصبح أكثر ذوبان في الماء و مهيباً للدخول في تفاعلات أخرى تدعى هذه الخطوة بالأبيض الأولي وفي معظم الأحيان يتم ارتباط المركب الناتج من الأبيض الأولي بمركبات طبيعية داخل أنسجة الكائن كالسكريات.

و يعزى عدم تأثر البكتريا *A.chroococcum* بالمبيدين المذكورين انفاً انها لا تنتج مواد تعزز نمو النبات فقط ولكنها أيضاً مقاومة لمبيدات الآفات المختلفة وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Gurikar وآخرون (2014) و Gurikar وآخرون (2015).

**5.7.4. تقييم كفاءة أوكسيد المغنيسيوم النانوي (MgONPs) وأوكسيد الزنك النانوي (ZnONPs) في البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc1) المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في الوسط NA:**

بينت النتائج (جدول 13) تفوق مادة أوكسيد المغنيسيوم النانوي على أوكسيد الزنك النانوي في تثبيط نمو البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* على الوسط الزراعي NA ولجميع التراكيز المستخدمة، وظهرت النتائج انه بزيادة تركيز المادة النانوية ازدادت النسبة المئوية لتثبيط البكتريا ، وتفوق التركيز 4.5غم/ لتر معنوياً على التراكيز الأخرى المستخدمة من أوكسيد المغنيسيوم النانوي اذ بلغت النسبة المئوية لتثبيط نمو البكتريا فيه 80.50% اما التراكيز 0.5، 1.25، 2.5 غم/لتر فكانت النسب التثبيط 14.05، 26، 37، 28، 45 ولم يختلف التركيزين 0.5 و 1.25 عن بعضهما معنوياً في تأثيرهما في البكتريا. اما مادة أوكسيد الزنك النانوي فأن التركيز 4.5 غم /لتر فقط اثر معنوياً في نمو البكتريا الممرضة وبنسبة تثبيط بلغت 4.59% في حين لم تظهر التراكيز الأخرى المستخدمة من هذه المادة اي تأثير يذكر في نمو البكتريا وبلغت النسبة المئوية للتثبيط فيها 0.0 % والتي لم تختلف معنوياً عن معاملة المقارنة 0.00% التي لم يستخدم فيها المادة النانوية. تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه باحثون آخرون والذين ذكروا انه يمكن استخدام مادة أوكسيد المغنيسيوم النانوي في تثبيط نمو البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام (Chen و 2005، Makhluf و 2012، Parizi وآخرون، 2014 و Zhao، وآخرون، 2018). وقد يعزى سبب تأثير الجسيمات النانوية (MgONPs) في تثبيط الممرض إلى المساحة السطحية العالية التي تكون في اتصال أكبر مع الكائنات الدقيقة وصغر حجمها الذي يمكنها من اختراق الجدران والاعشبية الخلوية بسهولة، مما يؤدي إلى تشوه الخلايا وتورمها وبالتالي تحللها مما يؤدي إلى انسياب الساييتوبلازم خارج الخلايا وموتها (Tang و Lv، 2014 و Ahmed وآخرون، 2016)، فضلاً عن هذا قد يعزى تأثير جسيمات أوكسيد المغنيسيوم النانوية (MgONPs) الى تكوين أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS بسبب وجود الشواغر على سطح الجسيمات النانوية إذ تفكك جزيئات الماء إلى  $H^+$  و  $OH^-$  وتتحول جزيئات

الأوكسجين المذاب في الماء إلى أيونات فائقة  $O_2^-$  والتي تتفاعل بدورها مع  $H^+$  لتوليد جذور  $HO_2$  وعند اصطدامها لاحقاً مع الالكترونات تنتج أيونات الهيدروكسيل  $HO_2^-$  وبعد ذلك تتفاعل مع أيونات الهيدروجين لإنتاج جزيئات بيروكسيد الهيدروجين  $H_2O_2$  التي تستطيع النفاذ عبر غشاء الخلية وقتل الكائنات الدقيقة وبما أن جذور الهيدروكسيل  $OH^-$  و  $O_2^-$  هي جسيمات مشحونة سلباً فلا تستطيع النفاذ إلى غشاء الخلية ويجب أن تبقى ملتصقة مباشرة مع السطح الخارجي للكائنات الدقيقة وتسبب تدهور بنية غشاء الخلية وموتها بسبب الارتباط مع الغشاء الخلوي ( Yamamoto وآخرون، 2010 و Emamifar وآخرون، 2011). وقد أفيد أن زيادة المساحة السطحية للـ MgONPS يؤدي إلى زيادة تركيز  $O_2^-$  أي كلما صغر حجم الجسيمة كلما أدى إلى تحلل أكثر لأغشية وجدران خلايا الكائنات الدقيقة ( Tang و Lv، 2014).

جدول (13) تأثير تراكيز مختلفة من مادة أوكسيد المغنيسيوم النانوي (MgONPs) و أوكسيد الزنك النانوي (ZnONPs) في تثبيط البكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* (Pcc1) في الوسط NA

(ZnONPs)	(MgONPs)	التثبيط % التركيز عم
0.00	14.05	0.5
0.00	26.37	1.25
0.00	45.28	2.5
4.59	80.50	4.5
0.00	0.00	Control
1.6635	15.305	L.S.D 0.05

- كل رقم في الجدول يمثل معدل لاربعة مكررات

8.4. تقييم كفاءة الفطر *T.harzianum* والبكتريا *A. chroococcum* واوكسيد المغنيسيوم النانوي والمبيدين الكيميائيين Beltanol و Goldston والتكامل بينهم في مقاومة البكتريا *carotovorum* *P. carotovorum* subsp. (Pcc1) تحت ظروف البيت البلاستيكي:

#### 1.8.4. النسبة المئوية للإصابة Percentage of infection:

اظهرت النتائج (جدول 14) ان جميع العوامل المستخدمة كان لها الاثر الفعال في خفض النسبة المئوية لإصابة درنات البطاطا بالبكتريا *carotovorum* *P. carotovorum* subsp. (Pcc1) معنويا قياسا بمعاملة البكتريا المرضية بمفردها والتي بلغت النسبة المئوية للإصابة فيها 100% في الدرنات المجرحة و88% في الدرنات غير المجرحة ، وقد تفوقت معاملة البكتريا الممرضة مع المبيد الكيميائي Beltanol والتي لم تختلف معنويا عن المعاملة Pcc1 + Beltanol واوكسيد المغنيسيوم النانوي ، Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol ، Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac ، Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Goldstone + Th ، Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Goldstone ، Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Goldstone + Th ، Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Beltanol + Goldstone اذ بلغت النسبة المئوية للإصابة في جميع هذه المعاملات 0.00 % والتي لم تختلف معنويا عن المعاملة بالماء المقطر المعقم ، والتي بلغت نسبة الأصابة فيها 0.00% تلتها وبفارق معنوي معاملة Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Goldstone والتي بلغت النسبة المئوية للإصابة فيها 2.10% ، وقد بلغت النسبة المئوية للتثبيط 4.63% ، 7.8% ، 8.7% ، 17.73% ، 19.30% ، 22.00% على التوالي في معاملات Pcc1 + Goldstone ، Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Th. ، Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac ، Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي .

جدول ( 14 ) كفاءة الفطر *T.harzianum* والبكتريا *A. chroococcum* واوكسيد المغنيسيوم النانوي والمبيدين الكيميائيين Beltanol و Goldston والتكامل بينهم في خفض نسبة الاصابة بالبكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* (Pcc1) تحت ظروف البيت البلاستيكي

المعاملات	% للإصابة
ماء مقطر فقط	0.00
البكتريا Pcc1 فقط (بدون تجريح)	88.00
البكتريا Pcc1 مع التجريح	100.00
اوكسيدالمغنيسيوم النانوي فقط	0.00
مبيد Beltanol فقط	0.00
مبيد Goldstone فقط	0.00
<i>T. harzianum</i> فقط	0.00
Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي	22.00
Beltanol + Pcc1	0.00
Goldstone + Pcc1	4.63
Th+ Pcc1	17.73
Ac + Pcc1	19.30
Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol	0.00
Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Goldstone	2.10
Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Th.	7.8
Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac	8.7
Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol + Th	0.00
Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol + Ac	0.00
Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Th + Goldstone	0.00
Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Goldstone	0.00
Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol + Goldstone + Th	0.00
Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol + Goldstone + Ac	0.00
L.S.D.0.05	0.4903

- كل رقم في الجدول يمثل معدل لاربعة مكررات

- *A. chroococcum* =Ac، *T.harzianum*=Th، *P. carotovorum subsp. carotovorum* =Pcc1 -

قد يعزى تأثير المبيد الكيميائي Beltanol في البكتريا الممرضة إلى قابليته في تكوين مركبات مخلبية مع النحاس داخل إنسجه العائل وبالتالي يسهل عملية مروره إلى داخل خلايا الممرض ثم بعد ذلك يتحرر ويؤدي إلى قتل المسبب المرضي (Meister، 2000 والخفاجي، 2020) بينما قد يعود تأثير اوكسيد المغنيسيوم النانوي في البكتريا الممرضة وفي خفض نسبة الاصابة بمرض التعفن الطري الى تحفيز المقاومة الجهازية في النبات عن طريق تنشيط مسارات اشارات حامض الساليسيلك والجسمونك والاثلين فضلا عن تعطيل فيزيائي وكيميائي مباشر للمسبب المرضي اثناء التفاعل بينهما،بالاضافة الى ذلك تحفيز

إنتاج بعض البروتينات التي لها علاقة بالإمراضية Pathogenesis related protein والتي تثبط نمو المسبب المرضي بشكل مباشر أو غير مباشر ، وقد ذكرت بعض الدراسات ان استعمال المواد النانوية يؤدي إلى أحداث خلا في الوظائف الخلوية للمسببات المرضية وبالتالي تثبيط نموها وذلك لخصائصها الفيزيائية والكيميائية اذ تعمل على زيادة المساحة السطحية للجسيمات نسبة لحجمها وبالتالي تزداد مساحة التلامس مع مختلف مسببات الأمراض وقدرتها على اختراق الأغشية الخاصة بخلايا المسببات المرضية (Kim وآخرون 2007).

اما الفطر *T.harzianum* فهو من الفطريات المستخدمة على نطاق واسع ضد العديد من مسببات الأمراض النباتية ، ومنها البكتريا ويعد هذا الفطر من الفطريات المفيدة جدا ومن مميزاته الاستشعار عن بعد والتعرف على الفطر الممرض والسرعة في مهاجمته وتثبيط نموه، فهو يحتوي على إنزيمات تعمل على تحلل جدران الممرضات النباتية مثل Chitinase ، Proteases ،  $\beta$ -13-glucanase ، Proteases و Srineprotase ( Haggag وآخرون،2006)، كما يعمل الفطر *T.harzianum* على تعزيز نمو النبات عن طريق افرازها لمنظمات نمو نباتية مثل هرمون الاثلين الذي يسرع انبات البذور ويعزز نمو بادراتها نتيجة للعلاقة التكافلية بين الفطر والمجموع الجذري وزيادة قابلية النباتات على مقاومة الظروف غير الملائمة سواء كانت بيئية مثل الجفاف أو حيوية مثل المسببات المرضية (Hirpara وآخرون، 2019 و Alizadeh وآخرون، 2020) ، وذكر Akrami و Zohreh (2015) ان هذا الفطر قادر على افراز بعض الانزيمات المحللة للمواد العضوية الموجودة أو المضافة للتربة وهذا بدوره يعمل على زيادة جاهزية العديد من العناصر المهمة لنمو النباتات مثل النتروجين والفسفور والبوتاسيوم والنحاس والزنك والحديد وهذا بالنتيجة سوف يحسن من صحة النباتات ومقاومتها الطبيعية للممرضات النباتية. بين Martinez وآخرون (2001) قدرة أنواع من الفطر *Trichoderma spp.* في زيادة نشاط عدد من الهرمونات الدفاعية في النباتات متمثلة بـ Ethylene و Salicylic acid و Jasmonic acid ( Contreras - Cornejo وآخرون ،2011)، إلى جانب دوره في عملية استحثاث المقاومة في النباتات ضد مختلف المسببات المرضية وهي احدى اليات الفطر المهمة ويعد انتاج Small protein 1 (بروتينات صغيرة) من البروتينات التي لها دور فعال من خلال تحفيز الجينات الدفاعية Defence - Related gene وأيضا في المقاومة الموضوعية والجهازية (Howell وآخرون، 2000) . ذكر الخفاجي (2020) و Abd-Elkhair (2021) ان الفطر *Trichoderma spp.* العديد من الإنزيمات التي تعمل على تحلل الجدار الخلوي للمسببات المرضية وبالتالي اختراق الخلايا وبدء عملية الاستعمار والتطفل على المسبب المرضي مثل إنزيم الـ Protease و Esterase و Phosphamidase فضلا عن انتاجه لعدد كبير من المضادات

الحيوية والتي من أهمها Dermadine ، Alamethicine ، Acetaldehyde ، Trichorzianines ، Alkylpyrones ، Dermadine ، Alamethicine ، Acetaldehyde ، Trichorzianines ،  $\beta$ -1 glucanases ، chitinases و 3. التي تثبط عمل بعض من إنزيمات المسبب المرضي وبالتالي العمل على إيقاف دورة المرض منذ البداية.

أما البكتريا *A. chroococcom* فقد يعزى تأثيرها في البكتريا الممرضة إلى تصنيعها العديد من المضادات الحيوية و منظمات النمو وهي مواد ذات تأثيرات مثبطة لعمليات فسلجية كيموحيوية معينة في الكائنات الحية الدقيقة و منشطة للنبات مثل الجبرلينات والسايوتوكانيينات والأوكسينات مما ينعكس على تحسين بيئة نمو الجذور، كما اثبتت قدرتها على تحسين نمو النبات ونسجة التربة وتقوم هذه البكتريا بأسغلال النيتروجين في الغلاف الجوي لتخليق البروتين الخلوي الذي يتم تثبيته في التربة (Ferreira وآخرون، 2019 و Farshad وآخرون 2020). كذلك تعد من الأحياء الدقيقة المنتجة لمثبطات مسببات الأمراض النباتية عن طريق افراز انزيمات خاصة مضادة للمسببات المرضية مثل الفطريات، والبكتريا مما يوفر حماية النبات مثل انزيم ACC deaminase الذي ينضم عمل منظمات النمو (Aasfar وآخرون، 2021) والانزيمات المحللة لجدران خلايا المسببات الممرضة للنبات والحاوية على الكايتين مثل Endochitinase و zarrin Chitobiosidase (Kurrey وآخرون ، 2018 و Pandey وآخرون، 2019). كذلك كان لبكتريا الـ PGPR دور كبير في خفض نسبة وشدة الإصابة لقدرتها على إنتاج المركبات الأيضية الثانوية مثل Lipopolysaccharides (LPs) و N-acyl-homoserine lactones (AHLs) التي تزيد المقدرة الدفاعية للنبات عن طريق تنشيط مسار تنظيم إنزيم Lipoxygenase (LOX) و ترسيب الكالوس وتراكم المركبات الفينولية (Han وآخرون، 2016 و Schikora، 2016).

أما المبيد Goldston فقد تعزى فعاليته ضد البكتريا الممرضة لاحتوائه على أوكسيد النحاس (نسبة النحاس 60% من تركيب المبيد) وبالتالي فهو يمنع تكاثر البكتريا وفي اغلب الأحيان يتسبب في موت أعداد كبيرة منها نتيجة لتأثير أيون النحاس ثنائي التكافؤ السام، إذ تعمل أيونات النحاس بشكل غير محدد (متعدد المواقع) على مستوى غشاء الخلية، مما يؤدي إلى التأثير على البروتينات الهيكلية والإنزيمية وتغيير نفاذية الغشاء و يمكن أن تدخل أيونات النحاس الذائبة إلى بروتوبلازم الخلية وعند دخولها تتداخل مع العديد من التفاعلات الأنزيمية (Steck و Grey، 2001 و Ordax وآخرون، 2005 و Aguirre و Pilon، 2016). وتتفق هذه النتائج مع الاسدي (2020) والذي وجد ان استخدام التكامل بين العوامل الاحيائية والمبيدات الكيميائية واوكسيد المغنيسيوم النانوي ادى الى نتائج معنوية وخفض كبير في النسبة المئوية

للإصابة وشدتها بمرض تعفن بذور وموت بادرات الطماطة المتسببة عن الفطر *Fusarium brachygibbosum*

#### 2.8.4. فعالية انزيم البيروكسيداز (POD) :

اظهرت النتائج (جدول 15) تفوق معاملة التكامل بين جميع العوامل المستخدمة في مكافحة البكتريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc1) معنوياً على المعاملات الأخرى في زيادة تركيز انزيم البيروكسيداز اذ بلغ معدله 41.02، 40.45 على التوالي عند استخدام المبيد الكيميائي Goldstone ، Beltanol مع اوكسيد المغنيسيوم النانوي Ac+ Th+ قياساً بمعاملة المقارنة السليمة والتي استخدم فيها الماء المقطر المعقم ومعاملة البكتريا الممرضة بمفردها بدون تجريح ومعاملة البكتريا الممرضة بمفردها مع التجريح والذي بلغ معدل انزيم البيروكسيداز فيها 15.44 ، 20.75 ، 21.77 على التوالي ، كذلك تظهر النتائج ان جميع العوامل المستخدمة في مكافحة سواء كانت احيائية او كيميائية او نانوية ادت الى زيادة معنوية في معدل فعالية انزيم البيروكسيداز وبدرجات متفاوتة قياساً بمعاملة المقارنة المجرحة وغير المجرحة.

وبينت النتائج ايضاً ان للوقت تأثير معنوي في مستوى انزيم البيروكسيداز إذ بلغ أعلى معدل لفعالية الانزيم في التداخل بين المعاملات والأيام في اليوم الخامس وتوقفت معاملة اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac+ Th+ Beltanol مع البكتريا الممرضة على المعاملات الاخرى في رفع مستوى الانزيم والذي بلغ 41.37 والتي لم تختلف معنوياً عن معاملة اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Th+Goldstone مع البكتريا الممرضة وبمستوى انزيم 40.74 . وانخفض مستوى الانزيم في جميع المعاملات بعد عشرة ايام من اجراء المعاملة.

جدول (15) تأثير تلقيح درنات البطاطا بالبكتريا الممرضة *P. carotovorum* subsp. *Pcc1* وعوامل المكافحة على فعالية انزيم البيروكسيديز.

معدل المعاملات	الوقت بالايام		المعاملات
	بعد 10 ايام	بعد 5 ايام	
15.44	15.20	15.68	ماء مقطر فقط
20.75	19.98	21.53	البكتريا Pcc1 فقط (بدون تجريح)
21.77	20.57	22.97	البكتريا Pcc1 مع التجريح
28.42	27.22	29.62	اوكسيد المغنيسيوم النانوي فقط
28.48	27.33	29.64	مبيد Beltanol فقط
28.35	27.15	29.55	مبيد Goldstone فقط
29.14	27.66	30.63	<i>T. harzianum</i> فقط
32.14	30.31	33.97	<i>A. chroococcum</i> فقط
26.63	24.04	29.23	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي
27.38	25.33	29.44	Beltanol + Pcc1
25.65	24.20	27.11	Goldstone + Pcc1
31.26	29.84	32.69	Th + Pcc1
26.41	25.63	27.20	Ac + Pcc1
34.29	33.60	34.98	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol
29.61	26.10	33.12	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Goldstone
36.59	35.55	37.63	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Th.
37.1	36.78	37.42	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac
39.48	39.73	39.24	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Th + Beltanol
39.29	38.94	39.65	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Beltanol
38.26	38.53	38.00	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Th + Goldstone
39.8	39.89	39.71	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Goldstone
41.02	40.67	41.37	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Th + Beltanol
40.45	40.16	40.74	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Th + Goldstone
-	30.191	32.223	معدل الوقت
التداخل	الوقت	المعاملات	L.S.D 0.05
1.2637	0.2694	0.8936	

- كل رقم في الجدول يمثل معدل لاربعة مكررات

-  $A. chroococcum = Ac$ ,  $T. harzianum = Th$ ,  $P. carotovorum$  subsp.  $carotovorum = Pcc1$

قد يعزى تأثير عوامل المقاومة الاحيائية *A. chroococcum*, *T. harzianum* في زيادة معدل انزيم البيروكسيديز في النباتات المعاملة الى دورها في عملية استحثاث المقاومة في النباتات ضد مختلف المسببات المرضية وتعد اهم الياتها تكوين البروتينات التي لها علاقة بالامراضية ومنها انزيم

البيروكسيديز، ذكر Sticher و آخرون، (1997) ان عوامل الاستحثاث قد تكون حيوية (Biotic) مثل مسببات مرضية ذات ضراوة (Virulence) وليس لها ضراوة (avirulence) ومسببات غير ممرضة (Non Pathogenic) مع العائل النباتي والكائنات الرمية التعايشية مع الجذور مثل PGPR. او تكون عوامل الاستحثاث غير حيوية (Abiotic) مثل المواد الكيماوية والمعادن والمركبات غير العضوية والاشعة فوق البنفسجية والمعاملة بالحرارة. إذ يستحث إنزيم Peroxidase في انسجة النبات عند التعرض للمسببات المرضية او المستحثات وله دور حاسم في تحديد مستوى مقاومة العائل وهو إنزيم رئيس في التخليق الحيوي لللكنين، وترسيب السوبرين، والتركيب الحيوي لجدار الخلية اي زيادة الدفاعات الهيكلية (Thakker وآخرون، 2013 و Jogaiah وآخرون، 2013). ويقوم بتحويل الـ extensins المفرزة في Apoplast من مونوميرات monomeric قابلة للذوبان إلى شبكة غير قابلة للذوبان وبالاعتماد على  $H_2O_2$  وبدورها تؤدي إلى زيادة الدفاع النباتي (Thakker وآخرون، 2013). ويعمل إنزيم Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) في التخليق الحيوي للمركبات الايضية الثانوية النباتية كإنتاج العديد من المركبات الفينولية التي تؤدي إلى زيادة ترسيب اللكنين وسمك جدران الخلايا (Chen وآخرون، 2017).

كما أن استعمال الجسيمات النانوية أدى إلى استحثاث المقاومة الجهازية ISR وزيادة في فعالية إنزيم Peroxidase وإنزيم PAL وتركيز الفينولات في نبات الطماطة في دراسات سابقة، إذ وجد Imada وآخرون (2016) كفاءة أكسيد المغنيسيوم النانوي MgONPs بتركيز 0.7% في استحثاث المقاومة في نبات الطماطة ضد مرض الذبول البكتيري المتسبب عن البكتريا *Ralstonia solanacearum* و لاحظ زيادة تراكم إنزيم  $\beta$ -1-glucanase وتكوين التايلوزات Tyloses في انسجة الخشب لنبات الطماطة، إذ عند مُعاملة النباتات بالـ MgONPs لوحظ تولد سريع لأنواع الأوكسجين التفاعلية ROS مثل الانيون الفائق  $O_2^-$  في جذور الطماطة المُعاملة بالـ MgONPs مما يشير إلى أن تولد  $O_2^-$  في الجذور قد يكون ناجماً عن تفاعل بين MgONPs و Polyphenols الموجودة في الجذور وهذه النتيجة تشير إلى أن MgONPs يحفز المقاومة الجهازية المستحثة ISR في النباتات المعاملة. وفي دراسة أخرى أظهرت عزلتان من بكتريا PGPR هي *P.aeruginosa* و *Azotobacter chroococcum* معزولة من جذور نباتات طماطة سليمة كفاءتها ضد الفطر *A.solani* المسبب لمرض اللفحة المبكرة على الطماطة لإنتاجها حاملات الحديد و HCN و Chitinase، فضلاً عن ذلك لوحظ زيادة في فعالية الإنزيمات الدفاعية مثل Peroxidase (PO) وإنزيم Polyphenol oxidase (PPO) وزادت من امتصاص المغذيات ومحتوى الكلوروفيل (Babu وآخرون، 2015).

## 3.8.4. تراكم الفينولات الكلية:

بينت النتائج (جدول 16) تفوق معاملة اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac+ Th+ Beltanol معنويا على المعاملات الاخرى المستخدمة في مكافحة البكتريا *P. subsp.carotovorum* (Pcc1) *carotovorum* في زيادة تراكم الفينولات الكلية وبمتوسط بلغ 243.78 ملغم/غم وزن طري وبفارق معنوي كبير عن معاملة المقارنة السليمة ومعاملة البكتريا الممرضة بدون تجريح الدرناات ومع التجريح والتي بلغ متوسط الفينولات الكلية فيها 139.10، 165.43، 173،73، ملغم /غم على التوالي تلتها معاملة اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Th+ Beltanol وبدون فارق معنوي وبمتوسط بلغ 227.04 ملغم/غم وتدرجت المعاملات الاخرى بينهما.

وبينت النتائج ايضا ان للوقت تأثير معنوي في تراكم الفينولات الكلية إذ بلغ أعلى معدل في التداخل بين المعاملات والأيام في اليوم العاشر وتوقفت معاملة اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol + Ac+Th مع الممرض وبمتوسط بلغ 298.68 ملغم / غم وزن طري تلتها وبفارق معنوي معاملة اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Th+Goldstone مع الممرض وبمتوسط بلغ 290.80 ملغم / غم . وبلغ اقل معدل لتراكم الفينولات الكلية في التداخل بين المعاملات والايام في اليوم الخامس وكانت معاملة الدرناات بالماء المقطر المعقم هي الاقل وبفارق معنوي عن جميع المعاملات الاخرى وبمعدل 130.44 ملغم /غم.

وقد تعزى هذه الزيادة في تراكم الفينولات إلى فعالية العوامل المستخدمة في مكافحة البكتريا *P. carotovorum carotovorum* (Pcc1) في هذه الدراسة في تحفيز ردود فعل النبات ضد العامل الممرض إذ يعد تحفيز الفينولات مؤثر على تحفيز المقاومة الجهازية ضد العامل الممرض، فقد ذكر Hassan و آخرون (2007) ان استحثاث المقاومة في العائل ضد المسببات الممرضة خلال تعرضه لها وبالتالي زيادة في فعالية انزيم البيروكسديز والذي يشارك في تحفيز انتاج الفايثوأكسينات من خلال أكسدة الفينولات وتحويلها إلى مواد أكثر سمية للمسببات المرضية، و ذكر Fernandez Fernandez (1989) إن التراكم السريع للفينولات يؤدي إلى تقييد العوامل الممرضة عند نقطة دخولها فضلا عن تنشيط الجينات المسؤولة عن انتاج البروتينات المرتبطة بالامراضية (pathogenesis related protein).

جدول (16) تأثير تلقيح درنات البطاطا بالبكتريا الممرضة (*Pcc1*) *P. carotovorum carotovorum* وعوامل المكافحة على الفينولات الكلية.

معدل المعاملات ملغم/ غم	الوقت بالايام			الفينولات الكلية المعاملات
	بعد 15 يوم	بعد 10 ايام	بعد 5 ايام	
139.10	142.39	144.47	130.44	ماء مقطر فقط
165.43	159.74	177.53	159.01	البكتريا Pcc1 فقط (بدون تجريح)
173.73	177.42	180.64	163.13	البكتريا Pcc1 مع التجريح
180.34	180.32	190.36	170.36	اوكسيدالمغنيسيوم النانوي فقط
173.32	170.55	186.21	163.21	مبيد Beltanol فقط
170.58	169.46	182.08	160.22	مبيد Goldstone فقط
184.13	185.34	187.67	179.38	<i>T. harzianum</i> فقط
169.05	160.35	176.69	170.13	<i>A. chroococcum</i> فقط
202.87	200.90	217.48	190.24	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي
182.01	177.45	198.22	170.36	Beltanol + Pcc1
174.90	169.40	189.65	165.67	Goldstone + Pcc1
204.80	180.31	257.77	176.33	Th+ Pcc1
187.03	190.05	200.13	170.91	Ac + Pcc1
201.62	193.71	221.99	189.16	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol
212.18	200.89	237.89	197.78	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Goldstone
219.90	196.23	285.48	178.01	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Th.
222.93	199.54	285.90	183.36	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac
227.04	202.73	289.31	189.09	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Th+ Beltanol
189.71	190.48	198.20	180.47	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Beltanol
218.34	200.70	260.56	193.76	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Th +Goldstone
191.71	193.52	200.50	181.13	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac +Goldstone
243.78	233.49	298.68	199.19	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac+ Th+ Beltanol
225.83	200.95	290.80	185.74	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Th+Goldstone
-	185.909	219.922	175.96	معدل الوقت
	التداخل	الوقت	المعاملات	L.S.D. 0.05
	11.585	2.4699	6.6885	

- كل رقم في الجدول يمثل معدل لاربعة مكررات

- *A. chroococcum* =Ac، *T.harzianum*=Th، *P. carotovorum carotovorum*=Pcc1

تتفق هذه النتائج مع نتائج دراسات سابقة فقد وجد Sivakumar و Sharma (2003) أن معاملة بذور الذرة الصفراء بأنواع من البكتريا المحفزة لنمو النبات ( Plant Growth Promoting Rhizobacteria) كنوع من المقاومة ضد الفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لمرض سقوط البادرات أدى إلى تراكم الفينولات وبعض الانزيمات منها أنزيم البيروكسيداز PO ومن ثم خفض نسبة الاصابة بهذا

المرض. ووجد Seleim (2014) زيادة في مستوى انزيم البيروكسيدوتراكم الفينولات واختزال نسبة الاصابة 66.67% تحت ظروف البيت الزجاجي و53.33% في الظروف الحقلية عند استخدام انواع من البكتريا *Pseudomonas spp.* لمقاومة البكتريا *Ralstonia solanacearum* المسببة لمرض ذبول الطماطة، وكما ذكر Shakir وآخرون (2018) ان المعاملة بمبيدات الافات ادت الى زيادة في مستوى انزيم البيروكسيدوزيادة في تراكم الفينولات الكلية.

كما ذكر Datnoff وآخرون (2000) ان للمواد الايضية المنتجة من قبل بعض الانواع ومنها *Trichoderma spp.* دورا مهما في جعل بعض العناصر المعدنية بحالة مخلبية غير قابلة للاتحاد مع مركبات كيميائية اخرى وبحالة جاهزة للامتصاص من قبل النبات. ووجد Akrami و Zohreh (2015) ان بعض انواع الفطر *Trichoderma spp.* تتميز بقابليتها على افراز بعض الانزيمات مثل Proteases و  $\beta$ -glucanases (1,6) و Chitinases و المحللة للمواد العضوية الموجودة او المضافة للتربة وبالتالي زيادة جاهزية العديد من العناصر المهمة للنبات مثل النتروجين، الفسفور ، البوتاسيوم ، الزنك ، الحديد وانعكاس ذلك على صحة النبات وبالتالي زيادة كافة معايير النمو فضلا عن زيادة مقاومته لمسببات الامراض النباتية. و اشار Senbayram وآخرون (2015) ان عنصر المغنسيوم Mg هو عنصر معدني اساسي لنمو النبات وتطوره ويشارك في العديد من العمليات الفسيولوجية والكيميائية الحيوية للنبات ويلعب دورا رئيسا في آليات الدفاع عن النبات في حالات الاجهاد البيئي، كما يشترك هذا العنصر في زيادة قابلية الدفاعات النباتية النسيجية ضد المسببات المرضية النباتية، ومن بين العديد من اوكاسيد المعادن غير العضوية المختلفة يعد MgONPs فعالا بشكل كبير في مكافحة المسببات المرضية النباتية بطرائق مباشرة عن طريق التماس المباشر مع المسبب المرضي وغير المباشر عن طريق استحثاث المقاومة الجهازية (Cai وآخرون، 2018).

بين Jayarambabu وآخرون (2016) أن بذور الذرة المُعاملة بتراكيز 50 ، 100 و 150 mg/L<sup>-1</sup> من جسيمات أوكسيد المغنسيوم النانوية (MgONPs) أعطت نسبة إنبات عالية وزادت من نشاط نمو البادرات مقارنة بمُعاملة المقارنة (من دون إضافة MgONPs) وحسنت نمو المجموع الجذري وأظهرت زيادة في الكتلة الحيوية، طول المجموع الخضري، وسجلت زيادة محتوى الكلوروفيل بعد 20 يوم من المُعاملة ووضح أن جسيمات أوكسيد المغنسيوم النانوي مهمة في تطبيقات الزراعة والبستنة من خلال الحد من الفطريات والبكتريا الضارة على البذور، ويمكن أن تكون كمصدر بديل للأسمدة. إن الوظيفة الأكثر شيوعاً للمغنيسيوم في النباتات هي دوره كذرة مركزية لجزيء الكلوروفيل في مجمع امتصاص الضوء للبلاستيدات الخضراء ومساهمته في التثبيت الضوئي لثاني أكسيد الكربون، وبسبب حركة المغنيسيوم العالية في اللحاء يمكن بسهولة

تحويله إلى الأجزاء النامية النشطة من النبات اذ تكون ضرورية لتشكل الكلوروفيل وذلك يؤدي إلى زيادة النمو الخضري (Cakmak، 2013 و Huber و Jones، 2013).

#### 4.8.4. الوزن الطري والجاف للمجموع الخضري:

اظهرت النتائج (جدول 17) ان جميع العوامل المستخدمة في مكافحة البكتريا الممرضة *P. carotovorum carotovorum* (Pcc1) ادت الى زيادة في الوزن الطري والجاف للمجموع الخضري لنباتات البطاطا قياسا بمعاملة البكتريا الممرضة مع التجريح والتي بلغ الوزن الطري والجاف 180.00 ، 21.00 على التوالي والتي اختلفت معنويا عن معاملة البكتريا مع الدرناات غير المجرحة والتي بلغ الوزن الطري والجاف فيها 301.00 ، 31.00 على التوالي ، وتفوقت معاملة Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac+ Th+ Beltanol معنويا على المعاملات الاخرى وسجل الوزن الطري والجاف فيها 937.67 ، 88.67 على التوالي تلتها وبفارق معنوي معاملة Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Th+Goldstone التي بلغ الوزن الطري والجاف فيها 860.00 ، 83.33 على التوالي ، وتفوقت جميع المعاملات على معاملة المقارنة السليمة في الوزن الرطب والجاف اذ بلغ 624.00 ، 61.00 على التوالي. وقد يعزى ذلك الى دور العوامل الاحيائية المستخدمة في زيادة جاهزية العناصر الغذائية للنبات التي انعكست على نمو النبات الخضري ومن ثم زيادة كفاءة عملية التركيب الضوئي وزيادة المواد المصنعة في انسجة النبات إذ إن نشاط الاحياء المجهرية يزيد من جاهزية وتيسير وزيادة امتصاص العناصر الغذائية من قبل النبات (Moyin-Jesu، 2014)، ومنها العناصر الضرورية الأساسية كالنتروجين والفسفور والبوتاسيوم التي أدت إلى زيادة المجموع الخضري ثم زيادة الحاصل ( العامري وآخرون، 2014) إذ يدخل الفسفور والنتروجين في تكوين المركبات الكربونية وفي تركيب الاحماض النووية DNA و RNA الضرورية لعملية الانقسام الخلوي، اما البوتاسيوم والكالسيوم فلهما أهمية كبيرة لعملها كمرافقات انزيمية ومنظمات للجهد الازموزي ولهما دور مهم في تنشيط عملية البناء الضوئي و نقل المواد الغذائية المصنعة في الأوراق إلى أماكن تخزينها في الدرناات أو الثمار وهذا يأتي نتيجة تواجدهما في جدران الخلايا ودورهما في عملية الانتقال عبر الاغشية الخلوية (Patrick وآخرون، 2001) وهذا ينعكس بشكل مفيد وايجابي على النمو الخضري وزيادة الحاصل، ووجد Wani وآخرون (2016) ان البكتريا A. *chroococcum* تقوم بتصنيع الاوكسينات (Auxins) والساييتوكاينينات (Cytokinins) وحامض الجبرلك (GA) وهذه المواد هي المواد الاساسية التي تنظم وتعزز نمو النباتات و تحفز نمو الاحياء الدقيقة في منطقة الريزوسفير (Rhizospher) و أنها تعطي حماية للنباتات من مسببات الامراض النباتية وتحسن من امتصاص المواد الغذائية ومن ثم تزيد من تثبيت النتروجين الجوي، كما اثبتت قدرتها على تحسين نمو

النبات ونسجة التربة (Khosravi وآخرون 2020)، ومن خلال دراسة اجراها Kumar وآخرون (2011) وجدوا ان استخدام البكتريا *Azotobacter* مع البكتريا التي لها القابلية على إذابة الفسفور PSB قد اثرت بشكل ايجابي في حاصل الدرنات. وذكر Bottini وآخرون (2004) و Safak و Nilfer (2006) ان بعض انواع البكتريا *Azotobacter* و *Pseudomonas* يمكن ان تعزز نمو النبات عن طريق انتاج الهرمونات النباتية مثل الاوكسينات والساييتوكاينينات والجبرلينات وحامض الابسك والتي تكون مفيدة لتحفيز نمو النبات وزيادة انتاجه.

جدول (17) تأثير تلقيح درنات البطاطا بالبكتريا الممرضة *P. carotovorum carotovorum* (Pcc1) وعوامل المكافحة في الوزن الطري والجاف للمجموع الخضري

وزن المجموع الخضري (غم)		المعاملات
الجاف	الطري	
61.00	624.00	ماء مقطر فقط
31.00	301.00	البكتريا Pcc1 فقط (بدون تجريح)
21.00	180.00	البكتريا Pcc1 مع التجريح
69.67	709.33	اوكسيدالمغنيسيوم النانوي فقط
63.63	659.50	مبيد Beltanol فقط
62.00	635.33	مبيد Goldstone فقط
74.67	745.67	<i>T. harzianum</i> فقط
78.00	742.33	<i>A. chroococcum</i> فقط
60.67	650.33	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي
71.00	680.67	Beltanol + Pcc 1
57.33	659.00	Goldstone + Pcc1
59.67	639.67	Th+ Pcc1
59.30	636.00	Ac + Pcc1
66.00	700.67	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol
65.33	690.33	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Goldstone
69.33	731.32	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Th.
68.67	725.67	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac
70.67	755.33	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Th+ Beltanol
70.67	741.67	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Beltanol
76.00	820.67	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Th +Goldstone
82.33	839.67	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac +Goldstone
88.67	937.67	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac+ Th+ Beltanol
83.33	860.00	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Th+Goldstone
5.4086	59.644	L.S.D. 0.05

- كل رقم في الجدول يمثل معدل لاربعة مكررات

- *A. chroococcum* =Ac، *T.harzianum*=Th، *P. carotovorum carotovorum*=Pcc1 -

ووجد Al Rubaye وآخرون (2019) ان استخدام نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *A. chroococcum* معززة بالسماذ المعدني كان لها تأثير معنوي في زيادة ارتفاع النبات والوزن الجاف للمجموع الخضري وحاصل النبات ومتوسط عدد الدرنات لنباتات البطاطا. ووجد Zahir وآخرون (1997) أن معاملة درنات البطاطا بالبكتريا *Azotobacter* قد أدى إلى زيادة كبيرة في حاصل الدرنات و أدى إلى زيادة امتصاص وتركيز العناصر الغذائية الرئيسية NPK في درنات البطاطا. وذكر Khosravi وآخرون (2020) ان البكتريا *Azotobacter* لديها القدرة على انتاج الفيتامينات مثل الثيامين والريبوفلافين و تنتج حامض الاندول والجبرلينات والسايوتوكاينينات.

واشار Pandey و Kumar (1989) أن اطلاق هذه المواد يعزز نمو النبات ومن ثم يزيد من انتاجيته، و ذكروا أن سلالات البكتريا *Azotobacter* تعمل على تحسين امتصاص العناصر الغذائية الرئيسية واستخدامها من قبل النبات، ذكر Aasfar وآخرون، (2021) أن البكتريا *Azotobacter* من أهم انواع البكتريا التي تثبت النتروجين الجوي في المحاصيل غير البقولية ومن ثم تعزز نمو النبات وانتاجه في العديد من المحاصيل وفي مختلف الترب الزراعية .

#### 5.8.4. عدد الدرنات القابلة وغير القابلة للتسويق:

اظهرت النتائج (جدول 18) فعالية جميع عوامل المكافحة المستخدمة في هذه الدراسة في زيادة عدد الدرنات القابلة للتسويق معنويا قياسا بمعاملي البكتريا الممرضة مع تجريح الدرنات وبدون تجريح اذ بلغ عدد الدرنات القابلة للتسويق فيها 0.33 ، 0.66 على التوالي واختلفت هاتان المعاملتان معنويا عن معاملة الدرنات السليمة والتي بلغت عدد الدرنات القابلة للتسويق فيها 5.66، وتفوقت معاملة Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac+ Th+ Beltanol على المعاملات الاخرى في عدد الدرنات القابلة للتسويق والذي بلغ 9.00 ولم تختلف هذه المعاملة معنويا عن معاملة Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Th+Goldstone و Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Goldstone، اما اقل معاملة في عدد الدرنات القابلة للتسويق فكانت Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Th. وبعدد درنات قابله للتسويق بلغ 4.33 والتي لم تختلف معنويا عن معاملة اوكسيد المغنيسيوم لوحده، Ac + Pcc1 ، Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Beltanol اذ بلغت 8.66 ، 8.00 ، 8.66 درنة/نبات على التوالي واختلفت جميع المعاملات معنويا عن معاملات الممرض لوحده . اتفقت هذه النتائج مع ما وجدته مرزة (2019).

جدول (18) تأثير تلقيح درنات البطاطا بالبكتريا الممرضة (*P. carotovorum carotovorum*) (Pcc1) وعوامل المكافحة على عدد الدرنات القابلة وغير القابلة للتسويق للنبات الواحد (درنة/ نبات<sup>1</sup>).

المعاملات		عدد الدرنات القابلة وغير القابلة للتسويق للنبات الواحد (درنة/ نبات <sup>1</sup> )
قابل للتسويق	غير قابل للتسويق	
0.66	5.66	ماء مقطر فقط
1.66	0.66	البكتريا Pcc1 فقط (بدون تجريح)
2.33	0.33	البكتريا Pcc1 مع التجريح
0.66	4.66	اوكسيدالمغنيسيوم النانوي فقط
0.65	6.57	فقط Beltanol مبيد
0.66	5.66	فقط Goldstone مبيد
0.33	7.66	<i>T. harzianum</i> فقط
0.33	7.33	<i>A. chroococcum</i> فقط
0.66	4.33	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي
0.33	7.00	Beltanol + Pcc1
0.66	6.66	Goldstone + Pcc1
0.33	6.66	Th+ Pcc1
1.33	4.66	Ac + Pcc1
1.00	6.66	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol
0.66	8.00	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Goldstone
0.66	8.00	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Th.
1.00	7.33	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac
1.00	7.00	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol + Th
0.66	8.66	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol + Ac
0.33	7.66	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Goldstone + Th
0.66	7.33	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Goldstone + Ac
0.66	9.00	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol + Th + Ac
0.33	8.66	Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Goldstone + Th + Ac
0.8829	1.297	L.S.D. 0.05

- كل رقم في الجدول يمثل معدل لاربعة مكررات

- *A. chroococcum* =Ac، *T.harzianum*=Th، *P. carotovorum carotovorum*=Pcc1

#### 6.8.4. وزن الدرنات القابلة وغير القابلة للتسويق :

اظهرت النتائج (جدول 19) فعالية جميع عوامل المكافحة المستخدمة في هذه الدراسة من زيادة وزن الدرنات القابلة للتسويق معنوياً قياساً بمعاملتي البكتريا الممرضة مع تجريح الدرنات وبدون تجريح اذ بلغ وزن الدرنات القابلة للتسويق فيها 13.86 ، 20.86 على التوالي واختلفت هاتان المعاملتان معنوياً عن معاملة الدرنات السليمة والتي بلغ وزن الدرنات القابلة للتسويق فيها 730.96 ، وتوقفت معاملة Pcc1 + اوكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol + Th + Ac على المعاملات الاخرى في اعطائها اعلى وزن

للدرنات القابلة للتسويق واقل وزن للدرنات غير القابلة للتسويق اذ بلغ 974.08 ، 19.94غم/نبات على التوالي والذي لم يختلف معنويا عن معاملة Pcc1 +اوأكسيد المغنيسيوم النانوي + Th+ Beltanol في وزن الدرناات القابلة للتسويق والذي بلغ 936.34 غم /نبات اما اقل معاملة في وزن الدرناات القابلة للتسويق فكانت معاملة Pcc1 +اوأكسيد المغنيسيوم النانوي و بوزن درنات بلغ 545.61 غم /نبات واختلفت جميع المعاملات معنويا عن معاملة البكتريا الممرضة مع تجريح الدرناات وبدونها. اتفقت هذه النتائج مع ما وجده مرزة (2019).

**جدول (19) تأثير تلقيح درنات البطاطا بالبكتريا الممرضة (*P. carotovorum carotovorum*) (Pcc1) وعوامل المكافحة في وزن الدرناات القابلة وغير القابلة للتسويق للنبات الواحد (غم. نبات<sup>-1</sup>).**

المعاملات		وزن الدرناات القابلة وغير القابلة للتسويق للنبات الواحد (غم)
قابل للتسويق	غير قابل للتسويق	
34.12	730.96	ماء مقطر فقط
82.15	20.86	البكتريا Pcc1 فقط (بدون تجريح)
100.63	13.86	البكتريا Pcc1 مع التجريح
40.73	865.80	اوأكسيد المغنيسيوم النانوي فقط
32.43	899.32	مبيد Beltanol فقط
38.82	820.63	مبيد Goldstone فقط
31.91	892.34	<i>T. harzianum</i> فقط
31.55	799.76	<i>A. chroococcum</i> فقط
45.38	545.61	Pcc1 + اوأكسيد المغنيسيوم النانوي
26.57	821.17	Beltanol + Pcc1
36.03	685.03	Goldstone + Pcc1
41.02	783.12	Th+ Pcc1
42.36	654.62	Ac + Pcc1
41.22	887.67	Pcc1 + اوأكسيد المغنيسيوم النانوي + Beltanol
39.29	877.02	Pcc1 + باوأكسيد المغنيسيوم النانوي + Goldstone
39.63	900.25	Pcc1 + اوأكسيد المغنيسيوم النانوي + Th.
43.22	778.36	Pcc1 + اوأكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac
38.52	936.34	Pcc1 + اوأكسيد المغنيسيوم النانوي + Th+ Beltanol
41.55	914.73	Pcc1 + اوأكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Beltanol
41.02	889.93	Pcc1 + اوأكسيد المغنيسيوم النانوي + Th + Goldstone
36.61	900.75	Pcc1 + اوأكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Goldstone
19.94	974.08	Pcc1 + اوأكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac+ Th+ Beltanol
31.94	918.11	Pcc1 + اوأكسيد المغنيسيوم النانوي + Ac + Th+ Goldstone
4.382	68.154	L.S.D <sub>0.05</sub>

- كل رقم في الجدول يمثل معدل لأربعة مكررات

- *A. chroococcum* =Ac، *T.harzianum*=Th، *P. carotovorum carotovorum*=Pcc1

## 5. الاستنتاجات والتوصيات

## 1.5. الاستنتاجات:

- 1- عزل 15 عزلة بكتيرية مرافقة لمرض التعفن الطري حيث كانت العزلة Pcc1 هي الاشد امراضية والتي تعود للبكتريا *P.carotovorum subsp.carotovorum* وهي ذات اختلاف وراثي مع نفس العزلات التابعة لهذا النوع و المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية (NCBI) لذا تم تسجيلها باسماء الباحثين و تحت رقم الادخال MW453066 وكان التشخيص الجزيئي هو تأكيد للتشخيص المظهري والكيموحيوي .
- 2- تمتلك العزلة البكتيرية Pcc1 المعزولة في هذه الدراسة مدى عائلي واسع حيث تمكنت من احداث المرض على جميع المحاصيل المختبرة في هذه الدراسة.
- 3- تفاوت اصناف البطاطا المزروعة في العراق في حساسيتها للإصابة بمرض التعفن الطري.
- 4- امتلاك فطر المقاومة الاحيائية *T.harzianum* والبكتريا *A. chroococcum* و *B.subtilis* مقدرة تضادية عالية ضد البكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا مختبريا.
- 5- اثبت اوكسيد المغنيسيوم النانوي بتركيز 4.5 غم/لتر كفاءة في تثبيط نمو البكتريا *P.carotovorum subsp. carotovorum* تحت ظروف المختبر والبيت البلاستيكي.
- 6- اثبتت المبيدات الكيميائية Beltanol و Goldstone بالتراكيز الموصى بها كفاءة في تثبيط نمو البكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* تحت ظروف المختبر والبيت البلاستيكي.
- 7- التكامل بين المبيدات الكيميائية والعوامل الاحيائية والمواد النانوية كان الافضل في التأثير في خفض النسبة المئوية للإصابة بالبكتريا *P. carotovorum subsp. carotovorum* المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا وزيادة معايير النمو و زيادة النسبة المئوية لإفراز انزيم البيروكسيدز والفينولات الكلية تحت ظروف البيت البلاستيكي.

## 2.5. التوصيات:

- 1- إمكانية اعتماد برامج مكافحة متكاملة تستعمل فيها العوامل الأحيائية المدروسة *B.subtilis* و *A.chroococcum* والفطر *T.harzianum* والمركبات النانوية ضد البكتيريا *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.
- 2- إجراء دراسات حول إمكانية عمل مستحضرات حيوية من العوامل الأحيائية المستعملة في هذه الدراسة ضد البكتيريا *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.
- 3- استعمال المبيدين الكيميائيين Beltanol و Goldstone في مكافحة والوقاية من الإصابة بمرض التعفن الطري على البطاطا.
- 4- تطبيق التشخيص الجزيئي والمظهري والكيموحيوي في التشخيص المبكر لمسببات الأمراض البكتيرية.

## 1.6.المصادر:References

- الأسدي، علي عبد علي عودة. (2020). استخدام بعض العوامل الاحيائية و الجسيمات النانوية والتراكيب الوراثية في مقاومة بعض مسببات امراض تعفن بذور و موت بادرات الطماطة (*Solanum lycopersicom L* رسالة ماجستير،كلية الزراعة. جامعة كربلاء.
- الجنابي، رجاء غازي عبد المحسن. (2001). دراسة حياتية ومقاومة البكتريا *Rastania solanacearum* المسببة لمرض الذبول البكتيري الجنوبي رسالة ماجستير كلية الزراعة. جامعة بغداد.
- الجنابي، رجاء غازي عبد المحسن. (2008). عزل وتشخيص سلالات البكتريا *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola (Burkholder) Young* المسببة لمرض اللحة الهلالية على الفاصوليا في بعض محافظات العراق واختبار طرق مختلفة لمكافحتها. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد.
- الخفاجي، سجاد جاسم عبد الحر. (2020). عزل وتشخيص البكتريا المسببة لمرض التدرن التاجي على شتلات اليوكالبتس *Eucalyptus camaldulensis Dehn* ومقاومتها باستخدام بعض العوامل الكيميائية و الاحيائية.كلية الزراعة. جامعة كربلاء.
- الدليمي، اسماعيل عباس جديع. (2000). تقويم كفاءة بكتريا *Pseudomonas fluorescens Migula* في استحثاث المقاومة الجهازية في نبات الخيار ضد الفطرين الممرضين *Pythium aphanidermatum* و *Pseudoperonospora cubensis*. اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد. ص74.
- الراوي ، خاشع محمود و عبد العزيز خلف الله. (2000). تصميم و تحليل التجارب الزراعية. كلية الزراعة و الغابات - جامعة الموصل . العراق.
- الصحاف، فاضل حسين. (1989). تغذية النبات التطبيقي. جامعة بغداد. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . العراق.
- العامري،نبيل جواد كاظم، احمد عبد الجبار جاسم و عبد الوهاب عبد الرزاق شاكر. (2014).تأثير رش مستخلص بعض المخلفات العضوية في نمو وانتاج الطماطة.مجلة العلوم الزراعية العراقية، 45(6): 615-627.
- العيساوي، ذياب عبد الواحد فرحان (2006). عزل و تشخيص بعض الفطريات المرافقة لمرض موت البادرات و تعفن جذور الرقي و مقاومتها بالطرق الإحيائية والكيميائية. رسالة ماجستير. الكلية التقنية المسيب-هيئة التعليم التقني.

- القرغولي، جبار محسن جابر. (1999). تأثير بكتريا *Pseudomonas fluorescens* والمعاملة بكبريتات الكالسيوم على مسببي مرض التعفن الطري *Erwinia carotovora var. carotovora* ومرض التعفن الجاف *Fusarium Solani* على درنات البطاطا في الحقل وأثناء الخزن ، اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد. العراق.
- اللوباوي، سلوان عبد الزهرة جبار: علي ، صادق محمد : الشافعي ، أديب كتاب عبد زيد و صبوري حسين ارسم (2018). تحليل بعض المبيدات الكيميائية بواسطة أنواع من الفطر *Aspergillus spp.* في الترب والاسمدة العضوية المختلفة . مجلة كربلاء للعلوم الزراعية 5(3): 31-44.
- بوراس، متيادي، بسام ابو ترابي و ابراهيم البسيط.(2006). انتاج محاصيل الخضر. الجزء النظري. مديرية الكتب والمطبوعات. مطبعة الداودي. جامعة دمشق. سوريا. ص 466.
- جعفر ، علا هادي .(2012).المقاومة الاحيائية والكيميائية لمرض ذبول اللوبياء المتسبب عن الفطرين *Rhizoctonia solani kuhn* و *Fusarium solani (Mart) Sacc*،رسالة ماجستير ، الكلية التقنية/المسيب ،هيئة التعليم التقني ،العراق .
- رمضان, محمد نديم و زهراء سالم المشهداني.(2006). عزل وتشخيص بكتريا مرض الساق الاسود في البطاطا. مجلة علوم الرافدين, 17(11): 193-203.
- شريف، فياض محمد. (2012). امراض النباتات البكتيرية. الذاكرة للنشر والتوزيع. العراق. ص288.
- شمران، زيد طالب (2017). تقويم فعالية بعض العوامل الاحيائية ومستحضر الاحياء المجهرية EM-1 ضد الفطر *Macrophomina phaseolina* مسبب مرض التعفن الفحمي على نبات زهرة الشمس. رسالة ماجستير، الكلية التقنية/المسيب-جامعة الفرات الاوسط التقنية.
- قازانجي، محمد عمر محي الدين و حميد عبود جبر. (2017). علم الحياة الجزيئي Molecular Biology. الطبعة الاولى. الدار الجامعية للطباعة والنشر والترجمة. كلية الزراعة. جامعة بغداد. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق. ص422.
- مرزة ،نزار راشد .(2019). عزل وتصنيف وامراضية البكتريا المسببة لتعفن درنات البطاطا الطري ومقاومته بالعوامل الحيوية البكتيرية *Pseudomonas fluorescens* و *Azotobacter chroococcum* و حامض السالسلك .اطروحة دكتوراه .كلية الزراعة .جامعة الكوفة.

- A.O.A.C. (1970).** Official Methods of Analysis 11 th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. USA.pp.1015.
- Aasfar,A.; Bargaz, A.; Yaakoubi, K.; Hilali,A.; Bennis, I.; Zeroual, Y. and Kadmiri, I. M. (2021).**Nitrogen Fixing *Azotobacter* Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. Front. Microbiol,12: 1-19.
- ABBOTT , W. S. (1925).** A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide .Journal of Economic Entomology, 18: 265–267.
- Abd El-Gawad, A. M.; M. H. Hendawey and Farag, H. I. A. (2009).** Interaction between biofertilization and canola genotypes in relation to some biochemical constituent under Siwa Oasis conditions. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 5(1):82:96.
- Abdel-Alim, A.I.; M.S. Mikhail ; F.M. Barakat ; P. Laux and Zeller,W. (2002).** Biological control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on potatoes by fluorescent pseudomonas and *Bacillus subtilis*. International Organisation for Biological Control /wprs Bull., 25 (6): 139-144.
- Abd-El-Khair, H.; Abdel-Gaied. T.G.; Mikhail, M. S.; Abdel-Alim, A. I. and Seif El-Nasr, H. I. (2021).** Biological control of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, the causal agent of bacterial soft rot in vegetables, in vitro and in vivo tests. Bulletin of the National Research Centre, 45:1-9.
- Aboutorabi,M. (2018).** Areview on the biological conrol of plant diseases using various microorganisms . J Res Medical Dental Sci 6:30-36.

- Abu-obeid, I.M.; Khlaif, H. and Salem, N. M. (2017).** Detection and identification of bacterial soft rot of Potato *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using specific PCR primers in Jordan. African Journal of Agricultural Research, 12(39):2910-2918.
- Adeolu, M.; Alnajjar, S; Naushad, S and Gupta, S.R. (2016).** "Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov.". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66 (12): 5575–5599.
- Agrios, G.N. (2005).** Plant Pathology. 5th Edition., Academic Press, San Diego. USA. pp.952.
- Aguirre, G. and Pilon, M. (2016).** Copper Delivery to Chloroplast Proteins and its Regulation. Front. Plant Sci., 6(1250):1-10.
- Agyemang, P.A; Kabir, M. N.; Kersey, C.M. and Dumenyo C. K. (2020).** The Bacterial Soft Rot Pathogens, *Pectobacterium carotovorum* and *P. atrosepticum*, Respond to Different Classes of Virulence-Inducing Host Chemical Signals. Horticulturae, 6(1):1-13.
- Ahmad, S.; Khan, M. A.; Ahmad, I. Iqbal Z.; Ashraf, E. Atiq, M.; Ali, Y. and Naseer, S. (2021).** Efficacy of fungicides, plant extracts and biocontrol agents against Ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under field conditions. Plant Science Today, 8(2):255-262.
- Ahmed, A.I.S.; Yadav, D.R. and Lee Y.S. (2016).** Applications of Nickel Nanoparticles for Control of Fusarium Wilt on Lettuce and Tomato. IJIRSET, 5:7379-7385.

- Ahmada, M.H.S.; Nagwa, H.S.A. and Aziza, A.A. (2017).** Introduction to nanotechnology: definition, terms, occurrence and applications in environment. *Limuj*, 2:12-26.
- Aissaoui, N.; Chobert, J.; Thomas .; Marzouki, M N. and Abidi F. (2017).** Purification and Biochemical Characterization of a Neutral Serine Protease from *Trichoderma harzianum*. Use in Antibacterial Peptide Production from a Fish By-Product Hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol*, 182:831-845.
- Aizawa, S. (2014).** The Flagellar World, Electron Microscopic Images of Bacterial Flagella and Related Surface Structures. Elsevier Inc., :58-59.
- Akram, M.; Rizvi, R.; Sumbul, A.; Ansari, R.A. and Mahmood, I. (2016).** Potential role of bio-inoculants and organic matter for the management of root-knot nematode infesting chickpea. *Cogent Food Agric.*, 2(1):1-13.
- Akrami, M. and Zohreh, Y. (2015).** Biological control of *Fusarium* wilt of tomato (*Solanum lycoperscum*) by *Trichoderma* spp. as antagonistic fungi. *Biological forum-an international Journal* 7(1):887-892.
- Akrimi, R.; Hajlaoui, H.; Rizzo, V.; Muratore, G. and Mhamdi, M. (2020).** Agronomical traits, phenolic compounds and antioxidant activity in raw and cooked Potato tubers growing under saline conditions. *Science of Food and Agriculture*, 100(9): 3719-3728.
- Al Rubaye, A.T.; H. A. Abdul-Ratha and Hadown, H.A. (2019).** Effect Of Local and Imported Bio fertilizers On Growth and Yield Of Potato . *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 50(1):434-445.
- Alaee, S. (2018).** Air Pollution and Infertility–A letter to Editor. *J of Environ Treat Tech*, 6(4): 72-3.

- Ali Khan, R.;Najeeb, S.;Hussain, S.;Xie, B. and Li Y. (2020).**Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. Against *Phytopathogenic* Fung Microorganisms, 8:1-22.
- Alizadeh, M.; Vasebi, Y.and, Safaie, N. (2020).** Microbial antagonists against plant pathogens in Iran: A review. *pen Agriculture* 5: 404-440 .
- AL-Razaq, A.H.A.; Hussien, W.A. and Mohammed, M.M. (2018).** Production Of Potato Under Soilless Culture. *Int. J. Agricult. Stat. Sci* 14(1): 299-310.
- Alwan, S.L.; Sukkar, A. R. (2010).** Testing the ability of some fungal species to bio-destroy some types of chemical pesticides. *Kufa University Journal of Life Sciences*, 2 :1-13.
- Ansari, R.A.and Mahmood, I. (2019).** Plant Health Under Biotic Stress. *Organic Strategies*, 1:978-981.
- Araujo, L.,, Cardoza, Y.F.; Duarte, V. and de Moraes, M. G. (2021).***Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* associated with canker on pear trees in Brazil.*European Journal of Plant Pathology*, 159:219–226.
- Babu, A.N.; Jogaiah, S.; Ito, S.; Nagaraj, A.K. and Tran,L.P.(2015).** Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated withtheir beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant Peroxidase and Polyphenol oxidase. *Plant Science*,231:62-73.
- Bahrulolum,H.; Nooraei, S.; Javanshir, N.; Tarrahimofrad, H.; Mirbagheri, V. ;Easton, A.and Ahmadianm G.(2021).**Green synthesis of metal nanoparticles using microorganisms and their application in the agrifood sector.*J Nanobiotechnology*,19(86):1-26 .

- Bangratz, M.; Wonni, I.; Kini, K.; Sondo, M.; Brugidou, C.; Béna, G. and Tollenaere, C. (2020).** Design of a new multiplex PCR assay for rice pathogenic bacteria detection and its application to infer disease incidence and detect co-infection in rice fields in Burkina Faso. *Plos one*, 15(4):1-13.
- Basu, A.; Prasad, P.; Das, S. N.; Kalam, S.; Sayyed, R. Z; Reddy, M. S. and El Enshasy, H. (2021).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. *Sustainability*, 13:1-20.
- Benítez, T.; Rincón, A.M.; Limón, M.C. and Codón, A.C. (2004).** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol*, 7:249-260.
- Bethke, P.C.; Halterman, D.A. and Jansky, S.H. (2019).** Potato germplasm enhancement enters the genomics era. *Agronomy* 9:1-20.
- Błaszczyk, L.; Siwulski, M.; Sobieralski, K.; Lisiecka, J. and Jędryczka, M. (2014).** *Trichoderma* spp. - Application and prospects for use in organic farming and industry. *J Plant Prot Res.* , 54(4):309-317.
- Bottini, R.; F. Cassan and Piccoli, P. (2004).** Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology Biotechnology*, 65: 497-503.
- Bradshaw, L. J. (1979).** *Laboratory microbiology*. W. B. Saunders company Philadelphia. London. Toronto
- Brown, J.D. and O. Lilliland. (1946).** Rapid determination of potassium and sodium in plant material and soil extracts by flame photometry. *Proceedings of the American Society Horticultural Science*, 48: 341-346.

- Brun,G.;Le, Hauwaert, M.; Leprince,A.; Glinel,K.; Mahillon,J. and Raskin, J.( 2021).**Electrical Characterization of Cellulose-Based Membranes towards Pathogen Detection in Water. *Biosensors*, 11(2), 1-20.
- Cai, L.; Chen, J.; Liu, Z.; Wang, H.; Yang, H. and Ding, W.(2018).** Magnesium Oxide Nanoparticles: Effective Agricultural Antibacterial Agent Against *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Microbiology*. 9(790): 1-19.
- Cakmak, I.(2013).** Magnesium in crop production, food quality and human health. *Plant and Soil*. 368:1-4.
- Carstens, A. B., Djurhuus, A. M., Kot, W. and Hansen, L. H. (2019).** A novel six-phase cocktail reduces *Pectobacterium atrosepticum* soft rot infection in Potato tubers under simulated storage conditions. *FEMS Microbiol. FEMS Microbiology Letters*, 366:1-8.
- Cellier, G.; Redondo, C.; Cubero, J.; Roselló, M.; de Andrade, E.; Cruz, L. and Yaseen, T. (2020).** Comparison of the performance of the main real-time and conventional PCR detection tests for ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp.. *European Journal of Plant Pathology* volume, 157:919–941.
- Charkowski ,A. O.( 2018 ).**The changing face of bacterial soft-rot diseases. *Annu. Rev. Phytopathol*,56:269–288.
- Chen, Y.; Fengjiao, L.i.; Tian, L.u.; Mingchao, H.; Rufang, D.; Xueliu, L.; Wei, C.; Pingzhi, W.; Meiru, L.; Huawu, J. and Guojiang ,W.(2017).** The 86 phenylalanine ammonia-lyase gene *LjPAL1* is involved 1 in plant defense responses to pathogens and plays diverse roles in *Lotus japonicus*-rhizobium symbioses. *Molecular Plant Microbe .Interact.* 30(9):739-753.

- Collmer ,A.; Schneider ,D. J.and Lindeberg ,M. (2009).** Lifestyles of the effector rich: genome-enabled characterization of bacterial plant pathogens. *Plant Physiol*, 150 :1623–1630.
- Colombowala, A.and Aruna, K. (2020).**Microbial Siderophores: A Prospective Tool for Strategic Medical Interventions.*Ind. J. Pure App. Biosci*, 8(6): 34-45.
- Contreras-Cornejo, H. A. ; Macías- Rodríguez , L.; Beltrán-Pena ,E. ;Herrera-Estrella, A. and López-Bucio , J. (2011).** *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal and camalex independent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Signaling and Behavior* , 6:10 1554-1563.
- Cresser, M. S. and J. W. Parsons .(1979).** Sulphuric-perchloric acid of digestion of plant material for determination of Nitrogen,Phosphorus, Potassium, Calcium and Magnesium. *Analytical Chimica Acta*, 109:431-436.
- Cui, L.; Yang, C.; Wei, L.; Li, T.and Chen, X. (2020).** Isolation and identification of an endophytic bacteria *Bacillus velezensis* 8-4 exhibiting biocontrol activity against Potato scab. *Biological Control*, 141, 1-12.
- Czajkowski, R.; Ozymko, Z.; Jager, V .; Siwinska ,J.; Smolarska, A.; Ossowicki A.; Narajczyk, M.and Lojkowska, E.(2015).** Genomic, proteomic and morphological characterization of two novel broad host lytic bacteriophages ΦPD10.3 and ΦPD23.1 infecting pectinolytic *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. *Plos one*, 10(3):1-23.
- Czajkowski, R.; Kaczyńska, N.; Jafra, S.; Narajczyk, M.and Lojkowska, E.(2017).** Temperature-responsive genetic loci in pectinolytic plant pathogenic *Dickeya solani*. *Plant Pathol*,66:584–594 .

- Czajkowski, R.; Pérombelon, M.C.M.; Jafra, S.; Lojkowska, E.; Potrykus, M.; van der Wolf, J.M. and Sledz, W. (2015).** Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing Potato blackleg and tuber soft rot. a review. *Ann. Appl. Biol*, 166: 18–38.
- Dadaşoğlu, F. and Kotan, R. (2017).** Identification and characterization of *Pectobacterium carotovorum*. *Journal of Animal and Plant Sciences* 27(2):647-654.
- Datnoff, L.E.; and Pernezy, K. L. (2000).** Effect of Bacteria and Fungal Microorganisms to Colonize Tomato Roots, Improve Transplant Growth and Control Fusarium Crown and Root Rot. *Plant Diseases*, 65: 168-178.
- Davidsson, P.R.; Kariola, T. ; Niemi, O. and Palva, E. T. (2013).** Pathogenicity of and plant immunity to soft rot Pectobacteria. *Front Plant Sci*, 4(191):1-13.
- De Boer, S.H. (2003).** Characterization of pectolytic *Erwinia* as highly sophisticated pathogens of plants. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 893–899.
- Debnath, S.; Chakraborty, G. ; Dutta, S. S.; Chaudhuri, S. R.; Das, P. and Saha, A. K. (2020).** Potential of *Trichoderma* species as biofertilizer and biological control on *Oryza sativa* L. cultivation. *Biotechnology Vegetal*, 20(1): 1 – 16.
- Dees, M.W.; Lysøe, E.; Rossmann, S.; Perminow, J. and Brurberg, M.B. (2017).** *Pectobacterium polaris* sp. nov., isolated from Potato (*Solanum tuberosum*). *Int J Syst Evol Microbiol* 67:5222–5229 .
- Deketelaere, S.; Tyvaert, L.; França, S. C. and Höfte, M. (2017).** Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium* wilt. *Front. Microbiol*, 8(1186) :1-23.

- Doolotkeldieva, T.; S. Bobusheva and Suleymankisi, A. (2016).** Biological Control of *Erwinia carotovora* spp. *carotovora* by *Streptomyces* Species. *Advances in Microbiology*. 6, 104-114.
- Droby, S. (2006).** Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: difficulties and challenges. *Phytopathol. Pol*,39: 105–117.
- Druzhinina, .I.S.; Kopchinskiy, A.G. and Kubicek, C.P. (2006).**The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47:55-64.
- Eden, P. A., Schmidt, T. M., Blakemore, R. P., & Pace, N. R. (1991).** Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(2), 324-325.
- Edwards-Jones, G. (2008).** Do benefits accrue to ‘pest control’ or ‘pesticides?’ a comment on Cooper and Dobson. *Crop Protection*,27:965–967.
- Eilenberg, J.; Hajek, A.; and Lomer, C. (2001).** Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Bio Control* ,46: 387–400.
- El-Argawy, E.; Rahhal, M.M.H.; El-Korany, A.; El-shabrawy, E.M. and El-tahan R.M. (2017).** Efficacy of Some Nanoparticles to Control Dampingoff and Root rot of Sugar Beet in El-Behiera Governorate. *Asian. Journal of Plant Pathology*,11(1):35-47.
- Elphinstone JG (2005).** The current bacterial wilt situation: a global overview. In: Allen C, Piror P, Hayward AC (eds) *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. APS Press, : pp 9–28.
- Emamifar, A.;Kadivar, M.; Shahedi, M.and Soleimanian-Zad, S.( 2011).** Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice.*Food Control* 22(4):408-413.

- Esikova, T. Z.;Anokhina, T. O.;Abashina, T. N.;Suzina, N. E. ;and Solyanikova, I. P.(2021).**Characterization of Soil Bacteria with Potential to Degrade Benzoate and Antagonistic to Fungal and Bacterial Phytopathogens.*Microorganisms*, 9(755):1-16.
- Essarts, Y. R. d.; Cigna,J.;Quêtu-Laurent, A.;Caron,A.;Munier,E.; Beury-Cirou, A.;Hélias,V.andFaure, D.(2021).** Biocontrol of the Potato Blackleg and Soft Rot Diseases Caused by *Dickeya dianthicola* .*Applied and Environmental Microbiology* ,82 ( 1 ):268-278.
- Fan ,J.; Ma, L.; Zhao C.; Yan, J.; Che, S.; Zhou, Z.; Wang,H.;Liuke ,Y.and Hu ,B. ( 2020 ).**Transcriptome of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* PccS1 infected in calla plants in vivo highlights a spatiotemporal expression pattern of genes related to virulence, adaptation, and host response. *Mol Plant Pathol* ,21(6):871-891.
- FAOSTAT Database (2019).** Potato world production statistics [http://www.growtomatoes.com/world\\_production\\_statistics.htm](http://www.growtomatoes.com/world_production_statistics.htm).
- Farrar, J. J.; J. J. Nunez and Davis, R. M. (2009).** Losses due to lenticel rot are an increasing concern for Karen county Potato growers. *California Agric*, 63: 127-130.
- Farshad, K.; Hosseini, S.A.; Hamidi, B. A.; Dimitri, R. and Tornabene,, F.(2020).**Nonlocal Torsional Vibration of Elliptical Nanorods with Different Boundary Conditions .*Vibration*, 3(3): 189-203.
- Fatima, Z. M.; Zia S. M.;Sultan, T.; Aslam, M. R.and Chaudhary, M.F.( 2009).** Antifungal activity of plant growth-promoting rhizobacteria isolates against *Rhizoctonia solani* in wheat. *Afr. J. Biotechnol.*, 8: 219-225.

- Fernandez, M. R. and Heath, M. C. (1989).** Interaction of non-host French bean plant (*Phaseolus vulgaris*) with parasitic and saprophytic fungi III cytological detectable responses. *Can. J. Bot.*, 67: 676 - 686.
- Ferreira, C. M. H.; Vilas-Boas, A.; Sousa, C. A.; Soares, H. M. V. M. and Soares, E. V. (2019).** Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. *AMB Express*, 9( 1):1-12.
- Fikadu, Z.(2020).** Pesticides use, practice and its effect on honeybee in Ethiopia: a review. *International Journal of Tropical Insect Science* 40:473-481.
- Fiorentino, N.; Ventrino, V.; Woo ,S.L.; Pepe, O.; De Rosa, A.; Gioia L, Romano,I; Lombardi, N.; Napolitano1, M.; Colla, G. and Roupheal, Y.(2018).** *Trichoderma*-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield, and nutritional quality of leafy vegetables. *Front Plant Sci.*,9:1-15.
- Fredricks, K. T.; Hubert,T. D.; Amberg, J.J.; Cupp, A. and Dawson, V. K.(2019).** Chemical Controls for an Integrated Pest Management Program.*North American Journal of Fisheries Management*, 41(1):1-12.
- Frisvad, J. C.; Hubka, V.; Ezekiel, C. N.; Hong ,S. B.; . Novakova, A.; Chen, A. J; Arzanlou, M.; Larsen, T.O. ; Sklenar, F.; Mahakamchanakul, W.; Samson, R. A. and J. Houbraken. (2019).** Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins *Studies in Mycology*, 93: 1–63.
- Gallelli, M. F. ; Cabrera, M. F. B.and Castillo, V . (2010).**A comparative study by age and gender of the pituitary adenoma and ACTH and alpha-MSH secretion in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism.*Res Vet Sci.*, 88(1):33-40.

- Gardan, L.; Gouy, C.; Christen, R. and Samson, R. (2003).** Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 53:381–391 .
- Gasic, K.; V. Gavrilovic; N. Dolovac; N. Trkulja; S. Zivkovic; D. Ristic, and Obradovic,A. (2014).** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* – the causal agent of broccoli soft rot in Serbia. Pestic. Phytomed. (Belgrade), 29(4):249–255.
- Ghoniem, A. A.;Abd El-Hai, K. M. ;El-khateeb, A. Y. ;Eldadamony, N. M. ;Mahmoud S.F. and Elsayed A.( 2021).**Enhancing the Potentiality of *Trichoderma harzianum* against *Pythium* Pathogen of Beans Using Chamomile(*Matricaria chamomilla*, L.) Flower Extract. Molecules, 26(1178):1-17.
- Giovannoni, M.; Gramegna,G.; Benedetti, M.and Mattei B.(2020).**Industrial Use of Cell Wall Degrading Enzymes: The Fine Line Between Production Strategy and Economic Feasibility. Front. Bioeng. Biotechnol., 8:1-20.
- Giri, B. S.;Geed, S.; Vikrant, K.and Lee, S. S.(2020).**Progress in bioremediation of pesticide residues in the environment. Environmental Engineering Research, 26(6):1-24.
- Goszczyńska, T.; Serfontein, J. J. and Serfontein S. (2000).** Introduction of Practical Phytobacteriology a Manual for Phytobacteriology. Safrinet-Loop of BioNet-International, 83pp.
- Gottsberger, R.A. and Huss, H. (2016).***Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing a soft rot on Styrian oil pumpkin in Austria .New Disease Reports ,33:12.

- Grey, B. E. ; Steck, T. R.(2021).** The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *APPL. Environ. Microbiol*, 67( 9):3866-3872.
- Gumede,T.( 2017 ).**Influence of calcium on yield and quality aspects of Potatoes (*Solanum tuberosum* L.) March Stellenbosch University, 1-18.
- Gupta, M.M.; Chourasiya, D. and Sharma, M.P.( 2019).** Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to sustainable plant production systems. In: *Microbial diversity in ecosystem sustainability and biotechnological applications. Sustainability*, 13:167–186.
- Gupta, P. K. (2018).** Toxicity of fungicides in Veterinary Toxicology. Cambridge, USA: Academic Press, 569–580 .
- Gupta, P. K. (2019).** Toxic Effects of Pesticides and Agrochemicals, in *Concepts and Applications in Veterinary Toxicology* .Cham: Springer, 59–82.
- Gurikar , C.; Naik ,M. K.and Sreenivasa, M. Y.(2015).** *Azotobacter* - PGPR Activities with Special Reference to Effect of Pesticides and Biodegradation .*Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*, 229-244.
- Gurikar ,C.; Adkar-Purushothama, C. R.; Naik, M. K.;Umdale, S.and Sreenivasa, M. Y. (2014).**Impact of Pesticides on PGPR Activity of *Azotobacter* sp. Isolated from Pesticide Flooded Paddy Soils. *Greener Journal of Agricultural Sciences* , 4 (4):117-129.
- Guttman,Y.; Joshi,J. R.; Chriker, N.; Khadka, N.; Kleiman, M.; Reznik, N.; Wei, Z.; Kerem, Z.and Yedidia, I.(2021).**Cological adaptations influence the susceptibility of plants in the genus *Zantedeschia* to soft rot *Pectobacterium* spp.*Horticulture Research*, 8(13):1-12.

- Haggag, W.M. and Abd-El-Khair. H. (2006).** Inhibition of barley blotch diseases by specific inhibition of fungal polyamine biosynthesis. *Plant Prot. Bull.*, 48: 311-330.
- Hammerschmidt, R.; E. M. Nuckles and Kuc, J. (1982) .** Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol Plant Pathol.* 20:73–82.
- Han, S.; Li, D.; Trost,E.; Mayer,K.F.; Vlot, A.C. and Heller, W. (2016).** Systemic responses of barley to the lactone producing plant beneficial endophyte *Acidovorax radialis* N35. *Frontiers in Plant Science*, 7:1868-1871.
- Haque, M. M .; Oliver, M. M. H. ; Nahar, K. 3; Alam ,M.Z.; Hirata, H.and Tsuyumu, Shinji.(2017).**CytR Homolog of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Controls Air-Liquid Biofilm Formation by Regulating Multiple Genes Involved in Cellulose Production, c-di-GMP Signaling, Motility, and Type III Secretion System in Response to Nutritional and Environmental Signals.*Front. Microbiol*,8(972):1-17.
- Harman, G.E.(2006).** Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96:190-194.
- Hassaan,M.A.and El Nemr,A. (2020).**Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(3): 207-220.
- Hassan, E. M.; S. Maggie; S. Saieda; I. H. El-Abbasi and Mikhail, M.S. (2007).** Changes in peroxidase activity due to resistance induced against faba bean chocolate spot disease. *Egypt. J. Phytopathol.*, 35:35-48.

- Hellmann, H.; Goyer A. and Navarre, D. A.(2021).**Antioxidants in Potatoes: A Functional View on One of the Major Food Crops Worldwide. *Molecules*, 26(2446) 1-29.
- Hemraj, V.; Diksha, S. and Avneet, G.( 2013).**A review on commonly used Biochemical test for bacteria. *Innovare Academic Sciences*,1(1):1-7.
- Hirpara, D.G.; Gajera, H.P.; Patel, A.K.; Katakpara, Z.A.and Golakiya, B.A. (2019) .**Molecular insights into development of *Trichoderma interfusants* for multistress tolerance enhancing antagonism against *Sclerotium rolfsii* Sacc. *J Cell Physiol*,5 (234):7368–7383.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T. and William, S.T. (1994)** Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilikins, Baltimore, 786-788.
- Howell, C. R. ; Hanson, L. E.; Stipanovic, R. D. and Puckhaber, L. S.(2000).**Induction of Terpenoid Synthesis in Cotton Roots and Control of *Rhizoctonia solani* by Seed Treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90(3):248-252.
- Hua, G. K. H.; Ali,E.and Ji, Pi. (2020).**Characterization of bacterial pathogens causing fruit soft rot and stem blight of bell pepper in Georgia, USA.*Journal of Plant Pathology*,102:311–318.
- Huber, D.M., and Jones, J.B.(2013).** The role of magnesium in plant disease. *Plant Soil* 368:73-85.

- Illescas M. ; Rubio, M. B.; Hernández-Ruiz, V.; Morán-Diez, M. E. ; Martínez de Alba, A. E. ; Nicolás, C. ; Monte, E.and Hermosa, R.( 2020).**Effect of Inorganic N Top Dressing and *Trichoderma harzianum* Seed-Inoculation on Crop Yield and the Shaping of Root Microbial Communities of Wheat Plants Cultivated Under High Basal N Fertilization. *Front. Plant Sci.* 11:1-21.
- Imada, K.; Sakai, S.; Kajihara, H.; Tanaka, S.and Ito, S. (2016).** Magnesium oxide nanoparticles induce systemic resistance in tomato against bacterial wilt disease. *Plant Pathol. Plant Pathology*,65: 551–560.
- Janda, J. M.; and Abbott ,S. L. (2007).** 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9): 2761–2764.
- Jayarambabu, N.; Siva, K.B.; Venkateswara, R.K. and Prabhu, Y.T.(2016).**Enhancement of growth in maize by biogenic-Synthesized MgO Nanoparticles. *International Journal of Pure and Applied Zoology*. 4(3):262-270.
- Jensen, H. L.(2021).** The Azotobacteriaceae. *Microbioloy and Molecular Biology Reviews* 8:195-213.
- Jiang, Xi.; Wang, Z.; Yang .; Chen, Z.; Yang, S.; Yan, Z. and Qin, Y.( 2021).**Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 18(10): 50-54.
- Jnawali, A.D.; Ojha, R.B.and Marahatta, S. (2015).** Role of Azotobacter in soil fertility and sustainability–A review. *Adv. Plants Agric. Res.*, 2(6):1–5.
- Jogaiah, S.; Govind, S.R. and Tran L.P.(2013).** Systems biology-based approaches toward understanding drought tolerance in food crops. *Journal Critical Reviews in Biotechnology*, 33(1):23-39.

- Jones, E. E. and Stewart, A. (2000).** Selection of mycoparasites of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from New Zealand Soils, New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 28: 105 – 114.
- Kabir, M.d.; Niamul, Ali T. and C. Korsi Dumenyo. (2020).**Development of PCR-Based Detection System for Soft Rot Pectobacteriaceae Pathogens Using Molecular Signatures. Microorganisms, 8(3): 358.
- Kamal, R.K.( 2018).***Trichoderma*: a Most Common Biofertilizer with Multiple Roles in Agriculture. Biomed J Sci Tech Res., 4(5):4136-4137.
- Khan, M. R.;Ahamad, F.and Fatima, T.F. (2019 ).**Effect of Nanoparticles on Plant Pathogens. Phytonanotechnology, 8: 215-240.
- Khan, M.Y.; Haque, M.M.; Molla ,A.H.; Rahman, M.M.and Alam, M.Z.(2017).** Antioxidant compounds and minerals in tomatoes by *Trichoderma*-enriched biofertilizer and their relationship with the soil environments. J Integr Agric,16:691-703.
- Khider, A. and Khidher ,A. M.( 2011).** Chromosomal nif genes transfer by conjugation in nitrogen fixing *Azotobacter chroococcum* to *Lactobacillus planetarium*. Current Res. J. of Biol. Sci., 3:155-164.
- Khosravi,H. and Dolatabad, H. K.(2020 ).** Identification and molecular characterization of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter salinestris* using Ardra, rep, eric, and box. Molecular Biology Reports, 47( 1):307–316.
- Kim, H.; Huh, H. J.; Park, E.; Chung, D.and Kang, M.(2021).**Multiplex Molecular Point-of-Care Test for Syndromic Infectious Diseases BioChip Journal ,15:14–22.

- Kim, Y.M.; Kuk, E.; Yu, K.N.; Kim, J.H.; Park, S.J. and Lee, H.J.(2007).** Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3:95-101.
- Kiraly , Z. and Klement , Z. (1974).** Methods in plant pathology wilt . 2ed International Bacterial wilt symposium . 22-27 June 1997 Franch West Indies.
- Klement, Z.; Farkas G. L. and Lovrekovich, L. (1964).** Hyper sensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*, 54: 474.
- Koh ,Y.J.; Kim,G.H. Lee,Y.S.; Sohn,S.H. Koh,H.S. Kwon,S.; Heu, S. and Jung, J.S. (2012).** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* subsp. nov., a new bacterial pathogen causing canker-like symptoms in yellow kiwifruit, *Actinidia chinensis*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*,40: 269-279.
- Köhl, J.; Booij, K.; Kolnaar, R. and Ravensberg, W. J. (2019).** Ecological arguments to reconsider data requirements regarding the environmental fate of microbial biocontrol agents in the registration procedure in the European Union. *Bio Control*, 64:469–487 .
- Kolomiets,Y.; Grygoryuk, I.; Butsenko, L.; Bohoslavets,V.; Blume,Y. and Yemets,A.(2021).** Identification and Biological Properties of the Pathogen of Soft Rot of Tomatoes in the Greenhouse *The Open Agriculture Journal*, 15(1): 21-32.
- Kong, H.G.; Song, G. C.; Sim, H. and Ryu, C. (2021).** Achieving similar root microbiota composition in neighbouring plants through airborne signalling *The ISME Journal*, 15:397-408.
- Korsten, L. and Jager,E.S. De (1995).** Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. *S. Afr. Avocado Growers Assoc. Yearb*, 18, 124-130.

- Kraepiel, Y. and Barny, M. (2016).** Gram-negative phytopathogenic bacteria, all hemibiotrophs after all?. *Mol Plant Pathol*, 17(3): 313–316.
- Kraft, J. M., Haware, M. P., Halila, H., Sweetingham, M., & Bayaa, B. (2000).** Soilborne diseases and their control. In *Linking Research and Marketing Opportunities for Pulses in the 21st Century* (pp. 457-466). Springer, Dordrecht.
- Krieg, N. R. and Dobereiner., J. (1984)** . *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* , Wilkins , Baltimore – London.
- Krofta, K.; Pokorný, J.; Kudrna, T.; Ježek, J.; Pulkrábek, J.; Křivánek, J. and Bečka, D. (2012).** The effect of application of copper fungicides on photosynthesis parameters and level of elementary copper in hops. *Plant soil environ.*, 58, (2): 91-97.
- Kumar, D. and Kalita, P. (2017).** Reducing Postharvest Losses during Storage of Grain Crops to Strengthen Food Security in Developing Countries. *Foods*, 6(1): 1-22.
- Kumar, M.; L. K. Baishya; D. C. Ghosh and Gupta, V.K. (2011).** Yield and quality of Potato (*Solanum tuberosum*) tubers as influenced by nutrient sources under rainfed condition of Meghalaya. *Indian Journal of Agronomy* 56 (3): 105-111.
- Kumar, S.; G. Stecher and Tamura, K. (2016).** MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33:1870-1874.
- Kumar, R.; Kumari, K.; Hembram, K.C.; Kandha, L. and Bindhani, B.K. (2019).** Expression of an *endo α-1, 3-Glucanase* gene from *Trichoderma harzianum* in rice induces resistance against sheath blight. *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, 28: 84-90.

- Kumar, V. and Arora, K. (2020).** Trends in nano-inspired biosensors for plants. *Materials Science for Energy Technologies*, 3: 255–273.
- Kurrey, D.K.; Sharma, R.; Lahre, M.K. and Kurrey, R.L. (2018).** Effect of *Azotobacter* on physio-chemical characteristics of soil in onion field. *Pharma Inn. J.*, 7(2):108-113.
- Lamichhane, J. R.; Arseniuk, E.; Boonekamp, P.; Czembor, J.; Decroocq, V.; Enjalbert, J.; Finckh, M.R.; Korbin, M.; Koppel, M.; Kudsk, P.; Mesterhazy, A.; Sosnowska, D.; Zimnoch-Guzowska, E. and Messéan, A. (2018).** Advocating a need for suitable breeding approaches to boost integrated pest management: a European perspective. *Pest management Science*, 74(6):1219-1227.
- Lee, S.; Vu, N. T.; Oh, E. J.; Rahimi-Midani, A.; Thi, T. N.; Song, Y.R.; Hwang, I.S.; Choi, T.J. and Oh, C. S. (2021).** Biocontrol of Soft Rot Caused by *Pectobacterium odoriferum* with Bacteriophage phiPccP-1 in Kimchi Cabbage. *Microorganisms*, 9(4):1-16.
- Lee, D.H.; Lim, J.A.; Lee, J.; Roh, E.; Jung, K. and Choi, M. (2013).** Characterization of genes required for the pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 in Chinese cabbage. *Microbiology (United Kingdom)*, 159: 1487– 1496.
- Li, L.; Yuan, L.; Shi, Y.; Xie, Xuewen.; Chai, A.; Wang, Q. and Li, B. (2019).** Comparative genomic analysis of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* SX309 provides novel insights into its genetic and phenotypic features. *BMC Genomics*, 20 (1):1-17.

- Li, X.; Ma, Y.; Liang, S.; Tian, Y.; Yin, S. and Xie, S. (2018).** Comparative genomics of 84 *Pectobacterium* genomes reveals the variations related to a pathogenic lifestyle. BMC Genomics, 19:889.
- Li, Z.; Yu, T.; Paul, R.; Fan, J.; Yangd, Y. and Wei, Q. (2020).** Agricultural nanodiagnosics for plant diseases: recent advances and challenges. Nanoscale Adv., 2(8): 3083–3094.
- Li, X.; Fu, L.; Chen, C.; Sun, W.; Tian, Y.; Xie H. (2020).** Characteristics and Rapid Diagnosis of *Pectobacterium carotovorum* ssp. Associated With Bacterial Soft Rot of Vegetables in China. Plant Disease, 104(4): 1158-1166.
- Liao, Y. Y.; Strayer-Scherer, A.; White, J. C.; Torre-Roche, R. D.; Ritchie, L.; Colee, J.; Vallad, G. E.; Freeman, J.; Jones, J. B. and Paret, M. L. (2019).** Particle-size dependent bactericidal activity of magnesium oxide against *Xanthomonas perforans* and bacterial spot of tomato. Scientific Reports, 9(18530 ):1-10.
- Linklater, D. P.; Baulin, V. A.; Juodkazis, S.; Crawford, R. J.; Stoodley, P. and Ivanova, E. P. (2021).** Mechano-bactericidal actions of nanostructured surfaces, 19 :8–22.
- Lopez, M. M.; M. J. Lopez-Lopez; R. Marti; J. Zamora; J. Lopez-Sanchez and Beltra, R. (2001).** Effect of acetylsalicylic acid on soft rot produced by *Erwinia carotovora subsp, carotovora* in potato tubers under greenhouse conditions. Potato Research, 44:197-206.
- Mabrouk, M.; Das, B. D.; Salem, Z. A. and Beherei, H. H. (2021).** Nanomaterials for Biomedical Applications: Production, Characterisations, Recent Trends and Difficulties. Molecules, 26, 1-27.

- MacFaddin, J.E. (2000).** Individual biochemical test for identification of medical bacteria . 3th ed . Lippincott Williams Wilkins.London.
- Mahato, S.; Bhuju, S.and Shrestha, J. (2018).** Effect of *Trichoderma Viride* As Biofertilizer on Growth and Yield of Wheat. *Malaysian J Sustain Agric.* 2(2):1-5.
- Mahdi, S.; Mukhtar, H.; Bashir, H. and Ali Nawaz.(2018).** Optimization of growth conditions for *Azotobacter* species and their use as biofertilizer. *jbmoa*, 6(5):274-278.
- Mahfouz, M. M. Abd-Elgawad and Askary, T. H. (2020) .** Factors affecting success of biological agents used in controlling the plant-parasitic nematodes. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(17):1-11.
- Maisuria, V.B. and Nerurkar, A.S. (2012).** Characterisation and differentiation of soft rot causing *Pectobacterium carotovorum* of Indian origin. *Eur. J. Plant Pathol.* 136(1): 87-102.
- Maja, A.; Zaczek,M.; Colin, C.; Fleming, G. K. ;Young, K. C. and Richard, O. (2019).***Pectobacterium* and *Dickeya* species detected in vegetables in Northern Ireland. *European Journal of Plant Pathology* , 154:635–647.
- Makhluf, S.; Dror, R.; Nitzan, Y.; Abramovich, Y.; Jelinek, R.and Gedanken A.(2005).** Microwave-Assisted Synthesis of Nanocrystalline MgO and Its Use as a Bactericide. *Adv. Funct. Mater.*, 15(10): 1708-1715.
- Martinez ,C.; Blanc ,F.; Le Claire ,E.; Besnard ,O.; Nicole ,M .and Baccou , J.C.(2001).** Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiology*, 127: 334-344.

- Maruyama, C.R.; Bilesky-José, N.; Lima, R. d. and Fraceto, L.F. (2020).** Encapsulation of *Trichoderma harzianum* Preserves Enzymatic Activity and Enhances the Potential for Biological Control. *Front Bioeng Biotechnol*, 8(225):1-14.
- Massi, F.; Torriani, S.F.F.; Borghi, L. and Toffolatti, S.L. (2021).** Fungicide Resistance Evolution and Detection in Plant Pathogens: *Plasmopara viticola* as a Case Study. *Microorganisms*, 9(1): 119.1-18.
- Meister, R.T. (2000).** Farm chemical handbook. Listing for Beltanol willough by OH. vol. 86. p. 45.
- Mekonnen, H. and Kibret, M. (2021).** The roles of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable vegetable production in Ethiopia. *Mekonnen and Kibret Chem. Biol. Technol. Agric.*, 8: (15):1-11.
- Meng, X.; Chai, A.; Shi, Y.; Xie, X.; Ma, Z. and Li, B. (2017).** Emergence of Bacterial Soft Rot in Cucumber Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in China. *Plant Dis.*, 101: 279–287.
- Mikhail, M.S.; Abdel-Alim, A.I.; Abd-El-Khair, H.; Abdel-Gaied, T.G. and Mohamed, S.A. (2019).** Host range and total cellular protein fingerprint of soft rot *Erwinia* isolated from some vegetables in Egypt. *Plant Arch*, 19(1):295–306.
- Mironenka, J.; Różalska, S.; Soboń, A. and Bernat, P. (2020).** Lipids, proteins and extracellular metabolites of *Trichoderma harzianum* modifications caused by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid as a plant growth stimulator. *Ecotoxicol Environ Saf*, 194:1-10.

- Mohammed, M. J. and E. D. Selman. (2013).** Detection of local *Erwinia* Isolates Causing Disease in Potato by Using DNA Amplification by Polymerase Chain Reaction Technique (PCR). *Journal of Al-Nahrain University*, 16(3):224-229.
- Molla, A.H.; Manjurul Haque, M.d.; Amdadul Haque, M.d.and Ilias, G.N.M.(2012) .** *Trichoderma*-Enriched Biofertilizer Enhances Production and Nutritional Quality of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and Minimizes NPK Fertilizer Use. *Agric Res*,1:265-272.
- Motyka-Pomagruk, A.; Zoledowska, S.; Sledz, W. and Lojkowska, E.(2021).**The occurrence of bacteria from different species of Pectobacteriaceae on seed Potato plantations in Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 159:309–325 .
- Moyin-Jesu, E. I. (2014).** Effects of water extracts of neem (*Azadirachta indica* L.) Leaf, Wood ash and their mixture on soil chemical composition and growth and yield of plantain (*Musa sapientum* L. ) *American Journal of Experimental Agriculture*, 4(7):836-848.
- Mukhopadhyay, S.S. (2014).** Nanotechnology in Agriculture: Prospects and Constraints. Invited review. *Nanotechnology: Science and Applications*, 7:63-71.
- Nabhan, S.; Wydra, K.; Linde, M.and Debener, T.( 2012).** The use of two complementary DNA assays, AFLP and MLSA, for epidemic and phylogenetic studies of pectolytic enterobacterial strains with focus on the heterogeneous species *Pectobacterium carotovorum*. *Plant Pathology*, 61:498-508.
- Nesmith, W. (2001).** Fungicide application guidelines for commercial vegetables in kentucky. *Plant pathology, fact sheet*. Cooperative extension service, Univ. of Kentucky- college of Agriculture.

- Ngadze ,E.;Mantsebo, C.C.; Mazarura, U.and Goss, M. (2012).**The epidemiology of *Pectobacterium* and *Dickeya* species and the role of calcium in postharvest soft rot infection of Potato (*Solanum tuberosum*) caused by the pathogens. African Journal of Agricultural Research, 9 (19): 1509-1515.
- Niemi, O. ; Laine, P.; Koskinen ,P.; Pasanen, M.; Pennanen, V.; Harjunpää, H.; Nykyri, J.; Holm, L. ;Paulin ,L.; Auvinen, P. ; Palva ,E.T. and Pirhonen, M.(2017).**Genome sequence of the model plant pathogen *Pectobacterium carotovorum* SCC1. Standards in Genomic Sciences ,12( 87): 1-8.
- Nienhaus K.; Wang, H. and Nienhaus, G.U. (2020).**Nanoparticles for biomedical applications: exploring and exploiting molecular interactions at the nano-bio interface. Materials Today Advances, 5 :1-20.
- Nuruzzaman, M. D.; Rahman, M. M.; Liu, Y. and Naidu, R. (2016).** Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: a new window for safe application. J. Agric. Food Chem, 64: 1447–1483.
- O'Brien, P. A. (2017).** Biological control of plant diseases. Australas. Plant Pathol. 46 (4), 293–304 .
- O'Neill, R. and Logan, C.(1975).** A Comparison of Various Selective Isolation Media for their Efficiency in the Diagnosis and Enumeration of Soft Rot Coliform Bacteria.Journal of Applied Bacteriology,39 (2):139-146
- Ordax, M.; Marco-Noales, E.; López, M. M.; and Biosca ,E. G. (2006).**Survival Strategy of *Erwinia amylovora* against Copper: Induction of the Viable-but-Nonculturable State. Appl Environ Microbiol. ,72(5): 3482–3488.

- Oskiera, M.; M. Kałuzna; B. Kowalska and Smolinska, U. (2017).** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* on Cabbage and Chines Cabbage: Identification, Characterization and Taxonomic Relatedness of Bacterial soft rot Causal Agents. *Journal of Plant Pathology*, 99 (1):149-160.
- Oulghazi, S.; Moumni, M.; Khayi, S.; Robic, K.; Sarfraz, S.; Lopez-Roques, C.; Vandecasteele, C. and Faure, D. (2020).** Diversity of Pectobacteriaceae Species in Potato Growing Regions in Northern Morocco. *Microorganisms*, 8: 895.
- Oulghazi, S.; Sarfraz, S.; Zaczek-Moczydlowska, M.; Khayi, S.; Ed-Dra, A.; Lekbach, Y.; Campbell, K.; Moleleki, L. N.; O'Hanlon, R. and Faure, D. (2021).** *Pectobacterium brasiliense*: Genomics, Host Range and Disease Management. *Microorganisms*, 9(1):1-26.
- Oztruk, M.; Aksoy, H.M.; Potrykus, M. and Lojkowska, E. (2018).** Genotypic and phenotypic variability of *Pectobacterium* strains causing blackleg and soft rot on Potato in Turkey. *Eur J Plant Pathol.*; 152: 143-55.
- Ozturk, M. And Aksoy, H.M. (2016).** First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Causing Blackleg and Soft Rot of Potato in Turkey. *J. Plant Pathology*, 98(3): 677-697.
- Pal, K.K. and Gardener, B. M. (2006).** Biological Control of Plant Pathogens. *Plant Health Instructor* 2 :1- 25.
- Pandey, A. And S. J. Kumar, (1989).** Soil beneficial bacterial and their role in plant growth promotion. *Science Indian Research*, 48:134-144.
- Pandey, S.; Gupta, S. and Ramawat, N. (2019).** Unravelling the potential of microbes isolated from rhizospheric soil of chickpea (*Cicer arietinum*) as plant growth promoter. *3 Biotech*, 9( 277) :1-9.

- Panth, M.; Hassler, S.C. and Baysal-Gurel F.(2020).**Methods for Management of Soilborne Diseases in Crop Production. *Agriculture*, 10(16):1-22.
- Parizi, M. A.; Moradpour, Y.; Roostaei, A.; Khani, M.; Negahdari, M. and Rahimi, G. (2014).** Evaluation of the antifungal effect of magnesium oxide nanoparticles on *Fusarium oxysporum F. sp. lycopersici*, pathogenic agent of tomato. *European Journal of Experimental Biology*, 4:151–156.
- Pasco, C.; M. Bozec; D. Ellisseche and Andrivon, D. (2006).** Resistance Behaviour of Potato Cultivars and Advanced Breeding Clones to Tuber Soft Rot Caused by *Pectobacterium atrosepticum*. *Potato Research*, 49:91–98.
- Patel, N.;Desai, P.;Patel, N.;Jha, A.;and Gautam, H. K. (2014).**Agronanotechnology for plant fungal disease management: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3: 71–84.
- Patrick, J. W.; W. Zhang; S. D. Tyerman; C. E. Offler and Walker, N. A. (2001).** Role of membrane transport in phloem translocation of assimilates and water. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28:695-707.
- Paul, A. Agyemang, M.d.; Kabir N.; Caleb, M. K. and Dumenyo, C. K. .(2020).**The Bacterial Soft Rot Pathogens, *Pectobacterium carotovorum* and *P. atrosepticum*, Respond to Different Classes of Virulence-Inducing Host Chemical Signals. *Horticulturae*, 6(1):13.
- Peňázová, E.; Dvořák, M.; Ragasová, L.; Kiss, T.; Pečenka, J.; Čechová, J. and Eichmeier, A. (2020).** Multiplex real-time PCR for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and pathogenic *Xanthomonas* species on tomato plants. *PloS one*, 15(1) :1-15.

- Pereira, S.I.A. ; Abreu, H.; Vega, M. A. and Castro, P.M.L. (2020).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) improve the growth and nutrient use efficiency in maize (*Zea mays* L.) under water deficit conditions. *Heliyon*, 6:1-9.
- Perombelon, M. C. M. (2006).** The Prokaryotes. Second Edition. pp: 2899- 2921.
- Perombelon, M.C.M. (2002).** Potato diseases caused by soft rot Erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, 51:1-12.
- Pomagruk, A. M.; Zoledowska, S. and Lojkowska, W.S. E. (2021).** The occurrence of bacteria from different species of Pectobacteriaceae on seed Potato plantations in Poland. *European Journal of Plant Pathology* , 159:309–325.
- Portier, P.; Pédrón, J.; Taghouti, G.; Fischer-Le Saux, M.; Caullireau, E.; Bertrand, C.; Laurent, A.; Chawki, K.; Oulgazi, S.; Moumni, M.; Andrivon, D.; Dutrieux, C.; Faure, D.; Hélias, V. and Barny, M.A. (2019)** . "Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 69(10):3207-3216.
- Poveda, J.; Hermosa, R.; Monte, E. and Nicolás, C.(2019).** *Trichoderma harzianum* favours the access of arbuscular mycorrhizal fungi to non-host Brassicaceae roots and increases plant productivity. *Scientific Reports*, 9:1-11.
- Rahman, M.; Khan, M. A. A.; Mian, I.H.; Akanda, M. and Alam, M.Z.(2017).** Effect of some chemicals on incidence of Potato soft rot disease in Bangladesh. *Journal of Scientific and Industrial Research* 52(2): 135-140.

- Rahmanifar, B.; N. Hasanzadeh; J. Razmi and Ghasemi, A. (2012).** Genetic diversity of Iranian Potato soft rot bacteria based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. *African J. Biotec.*, 11(6): 1314-1320.
- Ravari, A.K.; Othman, I.B. and Ibrahim, Z.B. (2011).** Finite element analysis of bolted column base connection without and with stiffeners. *Int. J. Phys. Sci.*, 6(1): 1-7.
- Safak, K. and A. Nilfer. (2006).** Some optimal cultural parameters for gibberellic acid biosynthesis by *Pseudomonas sp.* *Turk J Biol.*, 30: 81-85.
- Sahilah, A. M.; L. Rozeita; M.S.U. Kalsum and Son, R. (2008).** Typing of *Erwinia chrysanthemi* isolated from jospine pineapple in Malaysia using antimicrobial susceptibility, plasmid profiles, ERIC-PCR and RFLP analysis. *Int Food Res J.*, 15:1-8.
- Saikia, R.; R. Kumar; T. Singh; A. K. Srivastava; D. K. Arora and Lee, M. (2004).** Induction of defense related enzymes and pathogenesis related proteins in *Pseudomonas fluorescens*- treated Chickpea in response to infection by *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceri*. *Mycobiology*, 32(1): 47-53.
- Saikia, R.; R. Kumar; T. Singh; A. K. Srivastava; D. K. Arora and Lee, M. (2004).** Induction of defense related enzymes and pathogenesis related proteins in *Pseudomonas fluorescens*- treated Chickpea in response to infection by *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceri*. *Mycobiology*, 32(1): 47-53.

- Sambrook, J.; E. F. Fritch and Maniatis, J. 1989.** Molecular Cloning laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Edition. Coldspring Harbor Laboratory press, New York.USA.
- Sarfraz, S.; Riaz, K.; Oulghazi, S.; Cigna, J.; Sahi, S.T.; Khan, S.H. and Faure D.( 2018).***Pectobacterium punjabense* sp. nov., isolated from blackleg symptoms of Potato plants in Pakistan. Int. J. Syst. Evol. Microbiol,68:3551–3556.
- Sarjono, P. R.; Hazrina, Q. H.; Saputra, A.; Mulyani, N. S.; Aminin, A. L. N., Ngadiwiyanana, and Prasetya, N. B. A. (2020).** Isolation, characterization, and identification of endophytic bacteria by 16S rRNA partial sequencing technique from leaves of carica papaya and its potential as an antioxidant. In AIP Conference Proceedings.AIP Conference Proceedings, 2237(1):1-10.
- Sawada, H.; Horita, H.; Misawa, T.and Takikawa, Y. (2020).** Multiplex PCR assay to identify *Pseudomonas grimontii* and *P. marginalis* simultaneously. Journal of General Plant Pathology, 86(2) :81-85.
- Schaad, N. W.(1980).** Laboratory guide for identification of plant pathogenic dacteria . Bacteriology Committee of the American Phytopathological Society Pp720.
- Schaad, N.W. (1988).** Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria., Ed. 2:vii + 164 pp.;; many ref.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W.(2001).** Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd Ed. APS Press, St. Paul, MN. pp. 17-35.
- Schikora, A. (2016).** Beneficial effects of bacteria-plant communication based on quorum sensing molecules of the N -acyl homoserine lactone group. Plant Methods 90:605–612.

- Seleim M.A.; Kamal, A.;Abo-elyousr,K.A.M.; Mohamed, A. A.; Al-Marzoky, H.A.(2014).**Peroxidase and Polyphenoloxidase Activities as Biochemical Markers for Biocontrol Efficacy in the Control of Tomato Bacterial Wilt. *Journal of Plant Physiology & Pathology*,2(1):1-4.
- Senbayram, M.; Gransee. A.; Wahle, V. and Thiel, H.(2015).** Role of magnesium fertilizers in agriculture: plant–soil continuum. *Crop and Pasture Science*. 66:1219-1229.
- Sessitsch, A.; Pfaffenbichler, N. and Mitter, B. (2019).**Microbiome applications from lab to field: facing complexity. *Trends Plant Sci.*, 24:194-19 .
- Shakir,S.;Irfan, S.;Akhtar, B.; Rehman, S.; Khan, D.;Taimur ,N.andAzizullah, A. (2018).** Pesticide-induced oxidative stress and antioxidant responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings. *Ecotoxicology*, 27(9):1-17.
- Sharma, C.K.; Vishnoi, V.K.; Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K.(2018).** A twin rhizospheric bacterial consortium induces systemic resistance to a phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in mung bean. *Rhizosphere*, 5:71-75.
- Shayaa, H. and Hussein, W.A. (2019).** Effect of Neem (*Azadirachta indica*) leaves extract and organic fertilizer in the productivity and quality of two Potato es Varieties, *Iraqi Journal of Agricultural Sciences* 50(1): 275- 285.
- Shu, F.; Hanb, J.; Ndayambaje , J. P. ; Jiaa ,Q.; Sarsaiya, S.; Jaina, A.; Huangb, M.; Liuc M. and Chen, Jishuang(2021).**Transcriptomic analysis of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit T2 plus line provides insights in host responses resist *Pectobacterium carotovorum* infection.*Bioengineered*, 12( 1)1173–1188.

- Siddaiah C.N. ; Satyanarayana, N.R. ; Mudili, V. ; Gupta, V.K. ; Gurunathan ,S. ; Rangappa, S. ; Huntrike, S.S. and Srivastava, R.K. (2017).** Elicitation of resistance and associated defense responses in *Trichoderma hamatum* induced protection against pearl millet downy mildew pathogen. Scientific reports., 7: 1-18.
- Siddiqui, Z. A.; Hashmi, A.; Khan,M. R. and Parveen, Ai.(2020).**Management of bacteria *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, and fungi *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* and *Alternaria dauci* with silicon dioxide nanoparticles on carrot. International Journal of Vegetable Science, 26(6): 547-557 .
- Singh, H.; Sharma, A.; Bhardwaj,K.S.; Arya, S. K.; Neha, B. and Madhu, K.(2021).**Recent advances in the applications of nano-agrochemicals for sustainable agricultural development. Environ. Sci.,2: 191:382.
- Sivakumar, G. and R. C. Sharma, 2003.** Induced biochemical changes due to seed bacterization by *Pseudomonas fluorescens* in maize plants. Indian Phytopathology, 56(2):134-13.
- Skerman, V. B. D.; McGowan, V. and Sneath, P. H. A. (1980).** Approved Lists of Bacterial Names. International Journal of Systematic Bacteriology, 30:225-420.
- Sławiak, M.; Łojkowska, E. and van der Wolf, J. M. (2009).** First report of bacterial soft rot on Potato caused by *Dickeya* spp. syn. (*Erwinia chrysanthemi*) in Poland. Plant Pathol., 58, 794.

- Sridharan,A.P.;Thangappan,S.;Karthikeyan,G.;Nakkeeran,S.; Uthandib,S.(2021).**Metabolites of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 inhibits soil borne pathogen, *Macrophomina phaseolina* by triggering amino sugar metabolism. *Microbial Pathogenesis*,150: Page: 104714.
- Sticher, L.; B. Mauch-Mani and P. Metraux. (1997).** Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35: 235-270.
- Suárezza , S., Mu, T.; Sun H. and Añón, M. C.(2020).**Antioxidant activity, nutritional, and phenolic composition of sweet Potato leaves as affected by harvesting period. *International Journal of Food Properties*, 23(1): 178-188.
- Tahir, M. I.; M. Inam-ul-Haq and Akram Z.(2017).** Determination of Incidence of potato soft rot in major potato growing areas of Punjab, Pakistan. *Plant Protection*, 01(01):17-22.
- Tang, Z. and Lv,B. (2014).**MgO Nanoparticles as antibacterial agent: prpparation and activity. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*,31( 03)591- 601.
- Tariq, M.; Khan. A.; Asif ,M.; Khan, F.; Ansari, T.; Shariq, M. and Siddiqui, M.A .(2020).** Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science*, 70 (6):507-524.
- Terta, M, ;El Karkouri, A.; Ait M’hand, R.; Achbani, E.; Barakate, M.; Amdan, M.; Annajar, B.; El Hassouni, M.; Val, F.and Bouteau, F. ( 2010).**Occurrence OF *Pectobacterium carotovorum* strains isolated from Potato soft rot in Morocco. *Cellular and molecular biology*, 56: 1324–1333.

- Terta, M.; Azelmat, S.; M'hand ,R.; Achbani, E.; Barakate, M.; Bouteau, F. and Ennaji, M. (2013).** Molecular typing of *Pectobacterium carotovorum* isolated from Potato tuber soft rot in Morocco. BMC Microbiology, 13(176 ):1-7.
- Thakker, J.N.; Patel, S. and Dhandhukia, P.C. (2013).** Induction of defenserelated enzymes in banana plants: effect of live and dead pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. ISRN Biotech, 13:1–6.
- Thambugala, K. M. ; Daranagama, D. A. ; Phillips, A.J. L. ; Sagarika, D. K. and Promptutha, I. (2020).** Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. Front Cell Infect Microbiol, 10(604923)1-19.
- Timmusk, S. (2017).** Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. Front. Plant Sci., 8: 1-10.
- Toth, I. K.; Bell, K. S.; Holeva, M. C. and Birch, P. R. J. (2003).** Soft rot *Erwinia*: from genes to genomes. Molecular Plant Pathology, 4 (1): 17–30.
- Tumbariski, Y.; Georgiev, V.; Nikolova, R. and Pavlov, A. (2020).** Isolation, identification and antibiotic susceptibility of *Curtobacterium flaccumfaciens* strain PM\_YT from sea daffodil (*Pancreatum maritimum* L.) shoot cultures. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 9(6), 623-627.
- Umunna, O.E. and Austin ,A.A. (2016).** An Overview of Characterization and Identification of Soft Rot Bacterium *Erwinia* in Some Vegetable Crops. Greener J. Biological Sciences, 6(3): 46-55.
- Van Lenteren, J. C.; Bolckmans, K.; Köhl, J.; Ravensberg, W. J., and Urbaneja, A. (2018).** Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. BioControl, 63: 39–59.

- Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E.L.; Marra, R.; Woo, S.L. and Lorito, M. (2008).** *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology Biochemistry*, 40:1-10.
- Voronina, M. V.; Kabanova, A. P.; Shneider, M. M.; Korzhenkov, A. A.; Toschakov, S. V.; Miroshnikov, K. K.; Miroshnikov, K. A. and Ignatov, A. N., (2019).** First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing blackleg and stem rot disease of Potato in Russia. *Plant Disease*, 103(2): 364.
- Waals, J.E.V.; Ngadze, E. and Coutinho. (2010).** First Report of Soft Rot of Potatoes Caused by *Dickeya dadantii* in Zimbabwe. *Plant Disease*, 94(10)192-185.
- Waldee, E.L. (1945).** Comparative Studies of Some Peritrichous Phytopathogenic Bacteria. *Iowa State College Journal of Science*, 19: 435-484.
- Wani, S. A.; S. Chand; M. A. Wani; M. Ramzan and Hakeem, K. R. (2016).** *Azotobacter chroococcum*–A Potential Biofertilizer in Agriculture: An Overview. *Soil Science: Agricultural and Environmental Prospectives*, 333-348.
- Werra, P. d.; Kopp, C.; Häberli, M.; Stöcker, I.; Keil, A.; Debonneville, C.; Oberhänsli, T.; Altenbach, D. and Keiser, A. (2020).** Monitoring Potato seed lots to control blackleg in fields in Switzerland and southern Germany. *Plant pathology and plant pathogens*, 69: 1260-1260.
- William, W. W., Mackey K. & Chomczynski P. (1997)** .Effect of Ph and ionic strength on the spectrophotometer assessment of nucleic acid purity .*Biotechniques* 22:474-481.
- Wilson, E .E; Zeitoun, F. M.: and Fredrickson , D. L. ( 1967).** Bacterial ghloem canker , anew diseases of Persian walnut trees. *phytopathology* . 57:618:621.

- Winn, W. C.; S. Allen; W. Janda; E. Koneman; G. Procop; P. Schreckenberger and Woods, G.(2006).** Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth Edition.USA.pp.1535.
- Xue, A.G. ; Guo ,W. ; Chen, Y. ; Siddiqui, I. ; Marchand, G. ; Liu, J. and Ren, C. (2017).**Effect of seed treatment with novel strains of *Trichoderma* spp. on establishment and yield of spring wheat. Crop Prot., 96 : 97-102.
- Yamamoto, O.; Ohira, T.; Alvarez, K. and Fukuda M.(2010).** Antibacterial characteristics of CaCO<sub>3</sub>-MgO composites. Materials Science and Engineering,173:208-212.
- Yao,H.; Huang, Y.; Li, X.; Li, X.; Xie, H.; Luo, T.; Chen, J. and Chen, Z.(2020).**Underlying mechanisms of reactive oxygen species and oxidative stress photoinduced by graphene and its surface-functionalized derivatives. Environmental Science: Nano, 3: 691-998.
- Yishay, M.; Burdman, S.;Valverde, A.;Knaan, T. L.; Ophir, R. and Yedidia, I.(2008).** Differential pathogenicity and genetic diversity among *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* isolates from monocot and dicot hosts support early genomic divergence within this taxon. Environmental Microbiology , 10(10): 2746-2759.
- Youdkes, D.; Helman, Y.; Burdman, S.; Matan, O. and Jurkevitch, E.(2020).**Potential Control of Potato Soft Rot Disease by the Obligate Predators *Bdellovibrio* and Like Organisms. Applied and Environmental Microbiology,86(6):1-13.

- Yu, Z.; Li, Q.; Wang, J.; Yu, Y.; Wang, Y.; Zhou, Q. and Li, P. (2020).** Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field. *Nanoscale Research Letters*, 15(115):1-14.
- Zaczek-Moczydlowska, M.A.; Fleming, C.C.; Young, G.K.; Campbell, K and O’Hanlon, R. (2019).** *Pectobacterium* and *Dickeya* species detected in vegetables in Northern Ireland. *Eur. J. Plant Pathol.*, 154, 635–647.
- Zahir, A. Z.; M. Arshad; M. Azam and Hussain, A. (1997).** Effect of an auxin precursor tryptophan and *Azotobacter* inoculation on yield and chemical composition of Potato under fertilized conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 20(6):745-752.
- Zhang, Yi.; Malzahn, A. A.; Sretenovic, S. and Qi ,Y.(2019).** The emerging and uncultivated potential of crispr technology in plant science. *Nature Plants*, 5:778–794.
- Zhangm W.; Luo, Q.; Zhang, Y.; Fan, X. ; Ye T.; Mishra ,S.; Bhatt, P.; Zhang, L. and Chen, S. (2020).** Quorum Quenching in a Novel *Acinetobacter* sp. XN-10 Bacterial Strain against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* . *Microorganisms*,8(8):1-17.
- Zhao, R. T.; Kong, W.; Sun, M. X.; Yang, Y.; Liu, W. Y.; Lv, M. Song, S.; Wang, L. Song, H. and Hao, R. (2018).** Highly stable graphene-Based nanocomposite (GO-PEI-Ag) with broad-spectrum, long-term antimicrobial activity and antibiofilm effects. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10:17617–17629.
- Zhou, X .; Liu, Y. ;Huang, J.;Liu, Q. ; Sun, J.;Cai, X.; Tang, P.;Liu, W. and Miao, W. (2019).** High temperatures affect the hypersensitive reaction, disease resistance and gene expression induced by a novel harpin HpaG-Xcm. *Scientific Reports*,9(990):1-11

---

**Zin,N.A. and Badaluddin,N. A.( 2020).**Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricu Phys. Sci.*, 6(1): 1-7.

Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain ARK1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

LOCUS MW453066 1224 bp DNA linear BCT 14-  
JAN-2021  
DEFINITION Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain ARK1 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence.  
ACCESSION MW453066  
VERSION MW453066.1

KEYWORDS .  
SOURCE Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum  
ORGANISM Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum  
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;  
Enterobacteriales;  
Pectobacteriaceae; Pectobacterium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1224)  
AUTHORS Salem,A.T. and Abdulmoohsin,R.G.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (09-JAN-2021) plant production, University of  
Kerbala  
/college of Agriculture, Kerbala, Kerbla, central kerbala,  
Iraq  
COMMENT Sequences were screened for chimeras by the submitter using  
FinchTv  
1.5.

##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..1224  
/organism="Pectobacterium carotovorum subsp.  
carotovorum"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/strain="ARK1"  
/isolation\_source="Solanum tuberosum"  
/host="plant"  
/sub\_species="carotovorum"  
/db\_xref="taxon:555"  
/country="Iraq"  
rRNA <1..>1224  
/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN  
1 tgtctgga aa ctgcctgatg gagggggata actactggaa acggtagcta  
ataccgcata  
61 acgtcgcaag accaaagagg gggaccttcg ggcctcttgc catcggatgt  
gccagatgg  
121 gattagctag taggtgggggt aacggctcac ctaggcgacg atccctagct  
ggtctgagag  
181 gatgaccagc cacactggaa ctgagacacg gtccagactc ctacggggagg  
cagcagtggg  
241 gaatattgca caatgggcgc aagcctgatg cagccatgcc gcgtgtatga  
agaaggcctt

301 cgggttgtaa agtactttca gcggggagga agggagtaaa gttaatacct  
ttgctcattg  
361 acgttaccgg cagaagaagc accggctaac tccgtgccag cagccgcggt  
aatacggagg  
421 gtgcaagcgt taatcggaat tactgggcgt aaagcgcacg caggcggtt  
gttaagtcag  
481 atgtgaaatc cccgggctca acctgggaac tgcatctgat actggcaagc  
ttgagtctcg  
541 tagagggggg tagaattcca ggtgtagcgg tgaaatgcgt agagatctgg  
aggaatacgg  
601 gtggcgaagg cggccccctg gacgaagact gacgctcagg tgcgaaagcg  
tggggagcaa  
661 acaggattag ataccctggg agtccacgcc gtaaacgatg tgcacttgga  
ggttggtgcc  
721 ttgaggcgtg gcttccggag ctaacgcggt aagtcgaccg cctggggagt  
acggccgcag  
781 gttaaaactc aatgaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt  
ggtttaattc  
841 gatgcaacgc gaagaacctt acctggtcctt gacatccacg gaagttttca  
gagatgcaaa  
901 tgtgccttcg ggaaccgtga gacagggtgct gcatggctgt cgtcagctcg  
tgttgtgaaa  
961 tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcac cttatcctt tgttgccagc  
ggtccggccg  
1021 ggaactcaaa ggagactgcc agtgataaac tggaggaagg tgggatgac  
gtcaagtcac  
1081 catggccctt acgaccaggg ctacacacgt gctacaatgg cgcatacaaa  
gagaagcgac  
1141 ctgcgagag caagcggacc tcataaagtg cgtcgtagtc cggatgggag  
ctcgacaact  
1201 cgactccatg aagtcggaat cgct  
//

## **Abstract**

This study aimed to isolate and diagnose the bacteria that cause soft rot on potato in some fields, stores and markets in the Provinces of Karbala and Babylon, test its pathogenicity on tobacco leaves and potato slices, test the sensitivity of a number of potato varieties grown in Iraq to infection with this bacteria, determine the family range of the Pathogenic bacteria. and Finally, the study objected for evaluation of the effectiveness of a number of biological control agents, chemical pesticides, nano-materials, and their integration in combating disease in vitro and under greenhouse conditions. The experiments of this study were carried out in the Department of Plant Protection / College of Agriculture / University of Kerbala during the agricultural season of 2020-2021

The results of the isolation showed that 15 bacterial isolates were obtained from infected tubers Showed soft rot disease from all fields, storage and markets samples in Kerbala and Babylon Provinces. The pathogenic ability of this bacteria on tobacco leaves and potato slices proved that all the isolates were capable of causing the disease. isolates Pcc1, Pcc 6, Pcc9, Pcc11, and Pcc13 exceeded other isolates in the speed of symptoms on tobacco leaves, and their pathogenicity on potato slices, where the diameter of the affected tissues reached 4.7, 4.37, 4.5, 4.37, 4.5, Cim respectively.

The results of Morphological and biochemical examinations indicated that the bacteria was *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and this diagnosis was confirmed by polymerase chain reaction (PCR). The results of the analysis of the nuclotide sequences of the PCR-amplified products and using the BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool) showed that Pcc1 isolate belonged to the bacterium *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*,

which is genetically different from the same isolates belonging to these species. Therefore it was registered in the National Center for Biotechnology Information (NCBI), under the number MW453066.

The sensitivity test of some accession of potato cultivars to the infection by isolate Pcc1 showed that the Arezona was the most sensitive variety to infection as it was significantly superior to the other varieties through the affected tissue size reached 8.60 cm<sup>3</sup>.and The results of the family range disolyed that the bacterial isolate Pcc1 has the ability to cause the disease on potatoes, eggplant, turnip, beetroot, onion, Pumpkin, broccoli, cucumber, radish, and carrot with varying proportions.

The laboratory results of the antagonistic ability test between a number of biological factors and the pathogenic bacteria that causes soft rot disease using NA culture media and on potato slices showed that *Trichoderma harzianum* significantly (0.05)exceeded the other factors with an inhibition percentage reached 86.41 and 81.77% respectively.

As well as the results of testing the efficiency of a number of chemical pesticides against *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (at recommended concentrations), achieved an inhibition rate of 100% for the pesticides: Beltanol, Ganger, and Goldston that were significantly superior to Nordox, which had an inhibition rate of 21.56%. The results also revealed the superiority of nano-magnesium oxide in its inhibition of pathogenic bacteria over nano-ZnO in of for all concentrations used.

The control results *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* in the greenhouse showed the superiority of the interaction treatments between more than one factor in reducing the percentage of infection to 0.00% where the treatment of Pcc + nano-magnesium oxide + goldstone + bltanol + Th showed

a high efficiency in increasing the activity rates of the peroxidase enzyme, the total phenols accumulation, fresh and dry weight of shoot, number and weight of marketable tubers, at ( 41.02, 243.78, 50.09, 937.67, 88.67, 9.00, 974.08%), respectively, and with a significant difference compared (0.05) to the wounded and unwounded control treatment.

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Kerbala

College of Agriculture

Department of Plant Production



# **Molecular identification of bacteria causing soft rot on potatoes in Karbala and Babylon Provinces and control it using some biological factors and nano-compounds.**

Thesis submitted to The Council of the College of  
Agriculture/University of Kerbala as a partial Fulfilment of the  
Requirements for Degree of Master of Science in Agriculture –  
Plant Protection

By

**Alaa Taleb Salem Alamry**

Supervised By

**Prof.Dr. Rajaa Ghazi Abdal Moohsin AL Janabi**

**1443 A.H.**

**2021 A.D.**