

قسم الميكروبيولوجيا
أطروحة

N°/SNV/2020

مقدمة من طرف

بن شيخ عمر

لنيل شهادة

دكتوراه علوم

فرع: بيولوجيا

تخصص: ميكروبيولوجيا

الموضوع

البحث عن البكتيريا الجذرية من الجنس *Bacillus* و *Pseudomonas* ذات
النشاطية الضدية تجاه عوامل عدوى الفيوزاريوم (Fusariose) في الحبوب تحت
الظروف شبه الجافة.

نوقشت بتاريخ:/...../2020

أمام لجنة المناقشة

الرئيس	سيليني علاوة	أستاذ محاضر أ	جامعة فرحات عباس، سطيف 1
المشرف	رواق نور الدين	أستاذ التعليم العالي	جامعة فرحات عباس، سطيف 1
الممتحنون	دهيمات العيد	أستاذ التعليم العالي	جامعة الإخوة منتوري، قسنطينة 1
	بن حيزية يسين	أستاذ التعليم العالي	جامعة الإخوة منتوري، قسنطينة 1
	بن مدور طارق	أستاذ محاضر أ	جامعة محمد خيضر، بسكرة

مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية

اهداء

لمن أوصانى الله ببرهما

والدى العزيزين

لزوجتى التى كانت سندا لى فى كل الظروف

لأولادى الأعزاء

عبيد الله – قطر الندى -لجين

الى كل أساتذتى وزملائى الذين سهلوا اكمال هذا

العمل

أخص بالذكر صديقى وأخى

وليد معماش

تشكرات

أجريت جميع تجارب هذه الأطروحة على مستوى مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية، التابع لكلية علوم الطبيعة والحياة، جامعة فرحات عباس-سطيف.

في نهاية هذا العمل، أتوجه بالشكر والحمد والثناء لله عز وجل على ما يسر لي ووفقي الى القيام بهذا العمل واكمال أجزائه، وعلى ما من على من الصبر والقوة على ذلك.

ومن باب قوله صلى الله عليه وسلم: " لا يشكر الله من لا يشكر العبد"، أتقدم بجزيل الشكر الى الأستاذ نور الدين رواق الذي كان أكثر من مجرد مؤطر، بل كان بمثابة الأخ والناصح والموجه، أشكره شكرا كثيرا كأفضل ما يشكر طالب أستاذه الذي يحبه ويوقره.

أتقدم بالشكر الجزيل، أيضا، لأعضاء لجنة التحكيم الذين تفضلوا بتقييم ومناقشة هذا العمل المتواضع، الأستاذ علاوة سيليني، أستاذ محاضر (أ) بكلية علوم الطبيعة والحياة، جامعة فرحات عباس- سطيف. الذي شرفني برئاسة لجنة المناقشة، له مني كل الاحترام والتقدير.

الأستاذ دهيما العبد، أستاذ التعليم العالي بكلية علوم الطبيعة والحياة، جامعة الإخوة منتوري- قسنطينة 1. له مني كل الشكر والاحترام، على الإسهام في تقييم وتحسين هذه الأطروحة.

الأستاذ بن حيزية يسين، أستاذ التعليم العالي بكلية علوم الطبيعة والحياة، جامعة الإخوة منتوري- قسنطينة 1. له مني فائق الاحترام وجزيل الشكر، على المشاركة في تقييم هذه الأطروحة ومن ثم تحسينها.

الأستاذ بن مدور طارق، أستاذ محاضر (أ) بكلية علوم الطبيعة والحياة، جامعة محمد خيضر- بسكرة. له مني كل الشكر والثناء على مشاركته في مناقشة هذا العمل.

كما لا أنسى شكر كل من الأستاذة شريف-سيليني، الأستاذ يحيوي بلال اللذان قدما لي ما احتجت اليه من مواد وطرق ونصائح.

أشكر أيضا مدير وعمال المركز الوطني لمراقبة البذور والنباتات وتصديقها (CNCC)، الذين وفروا لي عينات بذور القمح التي جرت الدراسة عليها.

أشكر الأستاذ موفق عبد الناصر شكرا جزيلا على المساعدة المعنوية الكبيرة التي لطالما قدمها لي.

أتقدم بالشكر الجزيل لصديقي وأخي الأستاذ معماش وليد الذي كان ساعدي الأيمن في انجاز جزء كبير من هذا العمل.

أخيرا، أتقدم بالشكر الجزيل لكل من أسهم من قريب أو من بعيد في تسهيل هذا العمل وانجازه سواء باليد أو باللسان.

قائمة أهم المختصرات

rDNA :	Ribosomal Deoxyribonucleic Acid
rRNA:	Ribosomal ribonucleic Acid
PSA :	Potato Sucrose Agar
PDA :	Potato Dextrose Agar
CLA :	Carnation Leaf Agar
SNA :	Seawater Nutrient Agar
ITS:	Internal Transcribed Spacer
EF :	Elongation Factor
PSB :	Potato Sucrose Broth
FC :	<i>Fusarium culmorum</i>
Fa :	<i>Fusarium acuminatum</i>
Fs :	<i>Fusarium solani</i>
FCh :	<i>Fusarium chlamydosporum</i>
Feq :	<i>Fusarium equiseti</i>
GTAdur	Gaviate Duruma
GSC	Germination de Spore Control
GST	Germination de Spores traité
NA:	Nutrient Agar
NB:	Nutrient Broth
KB:	King B
YMA:	Yeast Mannitol Agar
CMC :	Carboxymethylcellulase
NBRIP :	National Botanical Research Institute's medium Phosphate
CAS :	Chrome Azurol S
IAA :	Indole Acetic Acid
WS :	Winogradsky
PW :	Peptone water
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
PGP :	Plant growth promoting
PCR :	Polymerase Chain Reaction
CNCC :	Centre National de Contrôle et Certification des plants et semences
VSL:	Vegetative System Length
RSL:	Root System Length
FWVS:	Fresh Weight Vegetative System
FWRS:	Fresh Root Vegetative System

المخلص

توجهت هذه الدراسة الى الكشف عن الفطريات الداخلية التابعة لجنس *Fusarium* في بذور القمح والتأكد من إمرضيتها ثم مكافحتها بالطرق البيولوجية. تمت عملية عزل الفطريات انطلاقا من 59 عينة تنتمي الى 7 أصناف من بذور القمح الصلب، تم الحصول عليها بطريقة عشوائية من مناطق مختلفة موزعة على 7 ولايات من الشمال الشرقي الجزائري. انطلاقا من هذا، تم تعريف 14 عزلة فطرية مظهريا بأنها تنتمي الى خمسة أنواع مختلفة من جنس *Fusarium*، وهي *F. acuminatum*، *F. culmorum*، *F. solani*، *F. chlamydosporum* و *F. equiseti*. أظهر التعريف الجزيئي للعزلات وجود النوعين *F. chlamydosporum* و *F. equiseti* اللذان تم التصريح بوجودهما لأول مرة في بذور القمح في الجزائر. أظهرت اختبارات القدرة الإراضية لهذه العزلات، على أصناف القمح: واحة، بوسلام و GTAdur، أن بإمكانها جميعا أحداث أضرار متفاوتة في تطور كل من غمد الريشة ونمو بذور القمح، بينما أثرت 4 عزلات منها سلبا على عدد ووزن الحبات في السنابل. أظهرت النتائج أن عزلات كل من النوعين *F. culmorum* و *F. chlamydosporum* كانت الأكثر عدائية، حيث خفضت هذه العزلات من طول كل من غمد الريشة والجذور بنسبة فاقت 65%. كما خفضت هذه العزلات طول ووزن كل من النظامين الجذري والهوائي بنسبة فاقت 36%. بالنسبة للمكافحة الحيوية تجاه العزلات الفطرية "في المخبر"، تم تقييم ضدية 188 سلالة بكتيرية من الجنس *Bacillus* و *Pseudomonas*. أظهرت النتائج أن 11 سلالة من الجنس *Bacillus* و 5 سلالات من الجنس *Pseudomonas* خفضت من نمو الميسيليوم بنسب فاقت 54% و 30% على الترتيب. ظهرت آلية تأثير البكتيريا من خلال تثبيط 5 سلالات من الجنس *Bacillus*، عملية انبات الكونيديات الفطرية بنسب تعدت 80%. من بين هذه السلالات، فإن السلالتين *B. amyloliquefaciens* BB18 و *B. amyloliquefaciens* BB19، خفضتا، بشكل معنوي، التأثيرات السلبية الناجمة عن عزلتي *F. culmorum* لكل من طول غمد الريشة والجذور وعدد فروعها، بنسبة فاقت 39%. أظهرت نتائج مكافحة الحيوية في الدفيئة، أن السلالة *B. atrophaeus* B16 خفضت التأثير السلبي للعزلة *F. culmorum* FC1 على كل من الطول والوزن الطازج للنظامين الجذري والهوائي بنسب فاقت 59%. بينما أعطت السلالة BB19 نفس النتائج لكن مع العزلة *F. culmorum* FC2. أظهر التوصيف البيوكيميائي للسلالات البكتيرية، تفوق سلالات *Bacillus* في إنتاج الأنزيمات المحللة للجدار الخلوي في حين أن سلالات *Pseudomonas* تميزت بإنتاج المركبات المحفزة للنمو النباتي، مثل AIA، الأمونيا، حاملات الحديد وأنزيم الفوسفاتاز.

الكلمات المفتاحية: القمح الصلب، *Fusarium*، إراضية، مكافحة حيوية، بكتيريا جذرية، *Bacillus*، *Pseudomonas*.

Résumé

Cette étude visait le dépistage des champignons endophytes du genre *Fusarium* inféodés aux graines de blé dur, de vérifier leur pathogénicité et la recherche de moyens biologiques pour leur contrôle. Les analyses d'identification ont concerné 59 échantillons de semences appartenant à 7 variétés de blé dur prélevés aléatoirement à partir de 7 Wilayas du Nord-Est algérien. A partir desquels, 14 isolats fongiques ont été phénotypiquement identifiés, appartenant à cinq espèces différentes du genre *Fusarium*. Il s'agit de *Fusarium acuminatum*, *F.culmorum*, *F.solani*, *F.equiseti* et *F.chlamyosporum*. L'identification moléculaire des isolats a révélé la présence de deux espèces en l'occurrence *F.chlamyosporum* et *F.equiseti*, signalées pour la première fois en Algérie dans des semences de blé. Le test de pathogénicité de ces isolats, sur trois variétés de blé, Waha, Bousellem et GTAdur, a montré qu'ils causaient tous des dommages variables au développement des coléoptiles et à la germination des semences de blé dur. Cependant, 4 isolats ont affecté négativement le nombre et le poids des grains dans les épis. Les résultats ont montré que les isolats de deux espèces *F.culmorum* et *F.chlamyosporum* étaient les plus agressifs, car ils réduisaient la longueur des coléoptiles et des racines de plus de 65%. Aussi, ces isolats ont agi négativement sur la longueur et le poids frais du système de racinaire et végétatif de plus de 36%. Le biocontrôle *in vitro* des isolats fongiques les plus pathogènes pour les semences et les semis de blé a été évalué à travers le test de 188 isolats bactériens rhizosphériques des genres *Bacillus* et *Pseudomonas*. Les résultats ont montré que 11 isolats du genre *Bacillus* et 5 isolats du genre *Pseudomonas* ont réduit la croissance mycélienne à des taux supérieurs à 54%, et 30%, respectivement. Le mécanisme d'action des rhizobactéries s'est manifesté à travers l'inhibition de la germination des conidies fongiques, où 5 isolats du genre *Bacillus* l'ont réduite à plus de 80%. Parmi ces isolats, les isolats *B.amyloliquefaciens* BB18 et *B.amyloliquefaciens* BB19 ont significativement diminué les effets négatifs de deux isolats de *F.culmorum* sur la longueur des coléoptiles et des racines et le nombre de leurs branches, estimées à plus de 39%. Les résultats du biocontrôle sous serre ont révélé que l'isolat *B.atrophaeus* B16 a réduit l'effet négatif de l'isolat *F.culomorum* 1 sur la longueur et le poids frais du système racinaire et végétatif à des taux supérieurs à 59%. Alors que l'isolat bactérien BB19 a donné les mêmes résultats, mais avec l'isolat fongique *F.culomorum* FC2 uniquement. La caractérisation biochimique des isolats bactériens, a montré la supériorité des isolats de *Bacillus* dans la production des enzymes dégradant la paroi cellulaire alors que les isolats de *Pseudomonas* étaient caractérisés par la production de composés stimulant la croissance des plantes tels que l'AIA, l'ammoniac, les sidérophores et l'enzyme de phosphatase.

Mots-clés: blé dur, *Fusarium*, pathogénicité, lutte biologique, rhizobactéries, *Bacillus*, *Pseudomonas*.

Abstract

This study aimed to detect endophytic fungi belonging to the genus *Fusarium* in durum wheat seeds, to verify their pathogenicity and the search for biological means for their control. The isolation was performed from 59 seed samples, belonging to 7 varieties of durum wheat, sampled randomly from 7 Wilayas in northeast Algeria. From which, 14 fungal isolates were phenotypically identified as belonging to five different species of the genus *Fusarium* namely *F. acuminatum*, *F. culmorum*, *F. solani*, *F. equiseti* and *F. chlamydosporum*. The molecular identification of the isolates revealed the presence of the two species *F. chlamydosporum* and *F. equiseti*, reported for the first time in Algeria in wheat seeds. The pathogenicity test on three durum wheat varieties: Waha, Bousellem and GTAdur, showed that they all caused variable damage to the development of coleoptiles and the germination of seeds. While 4 isolates affected negatively the number and weight grains in the ears. The results showed that the isolates of the two species *F. culmorum* and *F. chlamydosporum* were the most aggressive, since they reduced the length of the coleoptiles and the roots by more than 65%. they also decreased the length and fresh weight of the root and vegetative system by more than 36%. The *in vitro* biocontrol, on the most pathogenic fungal isolates, was evaluated by testing 188 rhizospheric bacterial isolates belonging to the genera *Bacillus* and *Pseudomonas*. The results showed that 11 *Bacillus* isolates and 5 *Pseudomonas* isolates reduced mycelial growth at rates greater than 54%, and 30%, respectively. Furthermore, 5 isolates of the genus *Bacillus* reduced the germination rate of fungal conidia by more than 80%. Among these isolates, the two isolates *B. amyloliquefaciens* BB18 and *B. amyloliquefaciens* BB19 reduced significantly the negative effects of the two isolates of *F. culmorum* on the length of the coleoptiles and roots and the number of their branches, estimated at more than 39%. Greenhouse biocontrol results revealed that the isolate *B. atrophaeus* B16 reduced the negative effect of the *F. culomorum* 1 isolate on the length and fresh weight of the root and vegetative system at rates more than 59%. Whereas the bacterial isolate BB19 gave the same results, but with the *F. culomorum* FC2 isolate only. The biochemical characterization of the antagonistic bacterial isolates, showed the superiority of the *Bacillus* isolates in the production of the cell-wall-degrading enzymes, whereas the *Pseudomonas* isolates were characterized by the production of plant growth stimulating metabolites such as AIA, ammonia, siderophores and the enzyme phosphatase.

Keywords: Durum wheat, *Fusarium*, pathogenicity, biocontrol, rhizobacteria, *Bacillus*, *Pseudomonas*.

قائمة الأشكال

رقم	العنوان	ص
شكل 1	بنية الساق والأوراق في نبتة قمح ناضجة.....	7
شكل 2	بنية سنبل القمح مع توضيح بنية السنبيلات.....	8
شكل 3	رسم تخطيطي لمكونات حبة وجنين القمح ودورها في عملية الإنبات.....	8
شكل 4	الدول العشر الأكثر إنتاجا للقمح سنة 2017.....	9
شكل 5	المردود العالمي والمساحة المزروعة من القمح في الفترة بين 2007 و2018.....	9
شكل 6	تطور كل من المساحة المزروعة، المردود وإنتاج القمح في الجزائر خلال الفترة الزمنية (2009-2018).....	10
شكل 7	توزيع انتشار الأمراض ذات المنشأ الفطري التي تصيب نبات القمح في الشمال الجزائري.....	13
شكل 8	مختلف الأعراض والعلامات لمرض تعفن التاج (FCR) في القمح.....	14
شكل 9	أعراض مرض لفحة السنابل (FHB) على القمح.....	16
شكل 10	دورة حياة <i>F. graminearum</i> أهم العوامل المسببة لمرض لفحة السنابل (FHB).....	19
شكل 11	صورة توضح مراحل ظهور أعراض مرض لفحة السنابل.....	21
شكل 12	صورة لحبات قمح مصابة حسب مرحلة الإصابة.....	21
شكل 13	صورة بالمجهر الإلكتروني لخلايا <i>Bacillus subtilis</i>	26
شكل 14	بكتيريا <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> تحت المجهر الإلكتروني الماسح.....	30
شكل 15	أهم المضادات الحيوية المصنعة من طرف سلالات المراقبة الحيوية (<i>Pseudomonas</i>).....	36

القسم الثاني: الجزء التطبيقي

شكل 1.I	المحور الأول: عزل وتشخيص الفطريات التابعة لجنس الـ <i>Fusarium</i> من بذور القمح مراحل عملية عزل الفطريات الداخلية من بذور القمح (الحصول على عزلات الـ <i>Fusarium</i>	39
شكل 2.I	مخطط يمثل إصيص يحتوي مختلف الطبقات التي تشرح طريقة دراسة تأثير الفطريات على الجزء القاعدي لشتلات القمح.....	44
شكل 3.I	المستعمرة الخاصة بالعزلتين FC1 وFC2، النوع <i>F. culmorum</i>	47
شكل 4.I	المستعمرة الخاصة بالعزلة FCh، النوع <i>F. chlamydosporum</i>	48
شكل 5.I	المستعمرة الخاصة بالعزلات Fa12.1، Fa11.5، Fa6.25، Fa6.12 و Fa33، النوع <i>F. acuminatum</i>	48
شكل 6.I	المستعمرة الخاصة بالعزل Feq25، Feq49 و Feq28، النوع <i>F. equiseti</i>	49
شكل 7.I	المستعمرة الخاصة بالعزلات Fs12.5، Fs6.21 و Fs35، النوع <i>F. solani</i>	50

51نسب أنواع الـ <i>Fusarium</i> المعزولة من العينات المصابة	شكل 8.I
53نسبة إصابة أنواع القمح بالأنواع المختلفة من الـ <i>Fusarium</i>	شكل 9.I
53نسبة الإصابة بأنواع الـ <i>Fusarium</i> حسب الولايات المعنية	شكل 10.I
54التوزيع الجغرافي لمختلف عزلات الـ <i>Fusarium</i> التي تم الحصول عليها	شكل 11.I
56صورة الهجرة الكهربائية على هلام Agarose لنواتج PCR للمنطقتين الجينيتين ITS1 و EF1 لعزلات الـ <i>Fusarium</i>	شكل 12.I
56تأثير نوع وسط الزرع على النمو الفطري لمختلف عزلات الـ <i>Fusarium</i>	شكل 13.I
60تأثير تغير درجة الحرارة على معدلات أقطار النمو لعزلات الـ <i>Fusarium</i> بعد 7 أيام من الحضانة	شكل 14.I
62تأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على انبات بذور القمح (نسبة تثبيط الإنبات)	شكل 15.I
63تأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على النمو الطولي لغمد الريشة (نسبة تخفيض طول غمد الريشة)	شكل 16.I
67الأعراض المسببة من طرف أحد العزلات الفطرية المختبرة	شكل 17.I
67تأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على طول النظام الجذري (معدل التخفيض)	شكل 18.I
69تأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على طول النظام الهوائي (معدل التخفيض)	شكل 19.I
70تأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على الوزن الطازج للنظام الجذري (معدل التخفيض)	شكل 20.I
72تأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على الوزن الطازج للنظام الهوائي (معدل التخفيض)	شكل 21.I
75تأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على نضج حبات القمح	شكل 22.I
76تأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على تشكل سنابل القمح	شكل 23.I
77تأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على معدل عدد حبات القمح في السنبل	شكل 24.I
78تأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على معدل وزن حبات القمح في السنبل	شكل 25.I

القسم الثاني: الجزء التطبيقي

دراسة ضدية بكتيريا المنطقة الجذرية تجاه عزلات الـ <i>Fusarium</i>	
85رسم تخطيطي يبين طريقة اختبار الضدية البكتيرية تجاه عزلات الـ <i>Fusarium</i>	شكل 1.II
87دراسة تأثير العزلات البكتيرية على انبات الكونيديات الفطرية	شكل 2.II
96نتائج المواجهة المباشرة بين أحد العزلات البكتيرية والفطر	شكل 3.II
101نسب تثبيط انبات الكونيديات الفطرية باستعمال عزلات البكتيرية الجذرية	شكل 4.II
103تأثير العزلات البكتيرية على الكونيديات الكبيرة للـ FC1 و FC2 بعد 24 سا من الزرع	شكل 5.II
104التأثير الوقائي للعزلات البكتيرية على غمد الريشة في وجود الـ <i>F.culmorum</i>	شكل 6.II
107التأثير الوقائي للعزلات البكتيرية على شتلات القمح في وجود الـ <i>F.culmorum</i>	شكل 7.II
110انتاج HCN من طرف أحد العزلات البكتيرية المختبرة (الى اليسار)	شكل 8.II
110معدلات أقطار نشاطية أنزيم الأميلاز المنتج من طرف العزلات البكتيرية	شكل 9.II
111معدلات أقطار نشاطية أنزيم البروتياز المنتج من طرف العزلات البكتيرية	شكل 10.II

112	معدلات أقطار نشاطية أنزيم السيلولاز المنتج من طرف العزلات البكتيرية.....	شكل.11.11
113	معدلات أقطار نشاطية أنزيم البكتيناز المنتج من طرف العزلات البكتيرية.....	شكل.12.11
114	معدلات أقطار نشاطية أنزيم الكيتيناز المنتج من طرف العزلات البكتيرية.....	شكل.13.11
115	اختبارات الكشف عن مختلف الأنزيمات المحللة.....	شكل.14.11
121	إذابة الفوسفات من طرف العزلات البكتيرية.....	شكل.15.11
123	إنتاج IAA من طرف العزلات البكتيرية.....	شكل.16.11
		نتائج اختبارات الكشف عن إنتاج الأمونيا وعن إنتاج حاملات الحديد من طرف	شكل.17.11
125	العزلات البكتيرية المختبرة.....	
125	النسب المئوية لإنتاج حاملات الحديد من طرف العزلات البكتيرية.....	شكل.18.11

قائمة الجداول

رقم	العنوان	ص
جدول 1.	التركيب الكيميائي لحبة القمح.....	7
جدول 2.	أهم البادئات المستعملة في التعريف الجزيئي لأنواع الـ <i>Fusarium</i>	18
جدول 3.	منتجات مكافحة الحيوية التجارية المعتمدة على أنواع الـ <i>Bacillus</i>	28

القسم الثاني: الجزء التطبيقي.

المحور الأول: عزل وتشخيص الفطريات التابعة لجنس الـ *Fusarium* من بذور القمح

جدول 1.I.	مخلص نتائج تجارب العزل والتعريف المظهري للفطريات الداخلية التابعة لجنس الـ <i>Fusarium</i>	51
جدول 2.I.	نتائج عملية التعريف الجزيئي للعزلات الفطرية باستعمال نوعين من أزواج البادئات..	55
جدول 3.I.	تحليل التباين لتأثير وسط الزرع على نمو عزلات الـ <i>Fusarium</i>	57
جدول 4.I.	تأثير وسط الزرع على إنتاج الأبواغ من طرف عزلات الـ <i>Fusarium</i>	58
جدول 5.I.	تحليل التباين لتأثير وسط الزرع على إنتاج الأبواغ من طرف عزلات الـ <i>Fusarium</i>	59
جدول 6.I.	تحليل التباين لتأثير درجة الحرارة على نمو عزلات الـ <i>Fusarium</i>	60
جدول 7.I.	تحليل التباين لتأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على انبات بذور القمح.....	62
جدول 8.I.	تحليل التباين لتأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على النمو الطولي لغمد الريشة.....	64
جدول 9.I.	تحليل التباين لتأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على طول النظام الجذري.....	68
جدول 10.I.	تحليل التباين لتأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على طول النظام الهوائي.....	69
جدول 11.I.	تحليل التباين لتأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على الوزن الطازج للنظام الجذري.....	71
جدول 12.I.	تحليل التباين لتأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على الوزن الطازج للنظام الهوائي.....	73
جدول 13.I.	دراسة الارتباط بين العوامل المدروسة (معاملات الارتباط).....	73
جدول 14.I.	تحليل التباين لتأثير عزلات الـ <i>Fusarium</i> على معدل عدد ووزن حبات القمح في السنبلة.....	79

القسم الثاني: الجزء التطبيقي.

المحور الثاني: دراسة ضدية بكتيريا المنطقة الجذرية تجاه عزلات الـ *Fusarium*

جدول 1.II.	المواقع الجغرافية لمختلف عينات التربة مع عدد العزلات من كل عينة.....	95
جدول 2.II.	نسب تثبيط النمو الشعاعي للميسيليوم الفطري لثلاث عزلات فطرية عن طريق عزلات البكتيرية الجذرية وباستعمال طريقة الزرع المزدوج.....	97
جدول 3.II.	تحليل التباين لتأثير كل من وسط الزرع والنوع الفطري على النشاطية الضدية للعزلات البكتيرية تجاه عزلات الـ <i>Fusarium</i>	98
جدول 4.II.	تأثير المركبات الطيارة البكتيرية على نمو الميسيليوم الفطري (المواجهة غير المباشرة).....	99

100	تحليل التباين لتأثير المركبات الطيارة البكتيرية النمو الشعاعي لعزلات الـ <i>Fusarium</i> .	جدول II.5
100	دراسة الارتباط بين نتائج المواجهة المباشرة وغير المباشرة للعزلات البكتيرية والفطرية.....	جدول II.6
102	تحليل التباين لتأثير العزلات البكتيرية على نسب انبات الكونيديات الفطرية.....	جدول II.7
105	معدلات التخفيض والوقاية لطول كل من غمد الريشة والجذور وعدد فروعها.....	جدول II.8
106	تحليل التباين للتأثير الوقائي للعزلات البكتيرية على طول كل من غمد الريشة والجذور وعدد فروعها.....	جدول II.9
108	تأثير العزلات البكتيرية على معايير النمو النباتي في وجود عزلتي <i>F.culmorum</i> ...	جدول II.10
109	تحليل التباين لتأثير العزلات البكتيرية على معايير النمو النباتي في وجود عزلتي <i>F.culmorum</i>	جدول II.11
116	ملخص التعريف الجزيئي للعزلات البكتيرية المختارة.....	جدول II.12
127	دراسة الارتباط بين السلالات البكتيرية ونسب انتاج كل من حالات الحديد، IAA وتحليل الفوسفات.....	جدول II.13

الفهرسة

ملخصات

قائمة الاختصارات

قائمة الأشكال

قائمة الجداول

1 مقدمة عامة

القسم الأول: مراجعة بيليوغرافية

4	عموميات حول نبات القمح (<i>Triticum sp</i>)	-1
5	الخصائص المورفولوجية	-2
5	المجموع الجذري (الجزء القاعدي)	-1.2
5	الجزء الهوائي	-2.2
5	الساق	-1.2.2
6	الأوراق	-2.2.2
6	القمة (النورة أو السنبله)	-3.2.2
6	الحبة	-4.2.2
7	أهمية إنتاج القمح	-3
8	أهمية إنتاج القمح في العالم	-1.3
9	أهمية إنتاج القمح في الجزائر	-2.3
10	العوامل المحددة لإنتاج القمح	-4
10	المحددات البيئية	-1.4
10	المحددات الحيوية	-2.4
12	وضعية الأمراض ذات المنشأ الفطري في الجزائر	-3.4
13	أمراض الذبول الفيوزاريومية في القمح (<i>Fusarium wilt diseases in wheat</i>)	-5
14	مرض تعفن التاج (FCR)	-1.5
15	مرض لفحة السنابل (FHB)	-2.5
16	العامل المسبب " مجموعة الـ <i>Fusarium</i> " (<i>Fusarium Complex</i>)	-3.5
16	التصنيف	-1.3.5
16	الأشكال اللاجنسية (Anamorphs)	-1.1.3.5
16	الأشكال الجنسية (Teleomorphs)	-2.1.3.5
17	تعريف أنواع الـ <i>Fusarium</i> المسؤولة عن الذبول الفيوزاريومي (<i>Fusarium wilt</i>) ...	-2.3.5
17	التشخيص المظهري (Morphological identification)	-1.2.3.5
17	التشخيص الجزيئي (Molecular identification)	-2.2.3.5
18	دورة الحياة	-3.3.5

18 اللقاح الأساسي (Primary inoculum)	-1.3.3.5
20 انطلاق المرض وتطور الفطر	-2.3.3.5
22 الظروف الملائمة لتطور المرض	-3.3.3.5
22 طرق ووسائل مكافحة	-6
22 مكافحة الزراعية (Agricultural control)	-1.6
23 مكافحة الوراثة (Genetic control)	-2.6
23 مكافحة الكيماوية (Chemical control)	-3.6
23 مكافحة البيولوجية (Biological control)	-4.6
24 محاسن المبيدات الحيوية (Advantages of Biopesticides)	-1.4.6
25 مساوئ المبيدات الحيوية (Disadvantage of biopesticides)	-2.4.6
25 البكتيريا الجذرية ذات الخاصية الضدية (Antagonistic rhizobacteria)	-5.6
25 الجنس <i>Bacillus</i>	-1.5.6
25 الخصائص العامة	-1.1.5.6
27 التصنيف المظهري	-2.1.5.6
27 التصنيف الحديث (Modern taxonomy)	-3.1.5.6
27 جنس الـ <i>Bacillus</i> كعوامل مكافحة حيوية	-4.1.5.6
30 الجنس <i>Pseudomonas</i>	-2.5.6
30 الخصائص العامة	-1.2.5.6
30 الخصائص الاستقلالية	-2.2.5.6
31 التصنيف والأصل الوراثي	-3.2.5.6
33 التوزيع البيئي	-4.2.5.6
33 الأهمية البيئية والاقتصادية	-5.2.5.6
34 جنس الـ <i>Pseudomonas</i> كعوامل مكافحة حيوية	-6.2.5.6

القسم الثاني: دراسة تطبيقية

المحور الأول: عزل وتشخيص الفطريات الداخلية لبذور القمح

37 مقدمة	-1
38 الوسائل والطرق	-2
38 العينات النباتية	-1.2
38 عزل الفطريات الداخلية	-2.2
39 التعريف المظهري للفطريات (دراسة ماكرو- وميكروسكوبية)	-3.2
40 التعريف الجزيئي	-4.2
41 دراسة تأثير درجة الحرارة ونوع وسط الزرع على نمو الفطريات المعزولة	-5.2
41 تأثير نوع وسط الزرع على النمو وعلى إنتاج الأبواغ	-1.5.2
41 دراسة تأثير تغير درجة الحرارة	-2.5.2
41 حفظ العينات	-6.2
42 اختبار القدرة الإراضية لعزلات الـ <i>Fusarium</i>	-7.2

42	اختبار القدرة الإمبراضية على ظهور ونمو غمد الريشة	-1.7.2
43	اختبار القدرة الإمبراضية على الجزء القاعدي لشتلات القمح	-2.7.2
44	اختبار القدرة الإمبراضية على عدد ووزن حبات القمح في السنابل	-3.7.2
45	الدراسة الإحصائية للنتائج	-8.2
46	النتائج والمناقشة	-3
46	عزل الفطريات الداخلية	-1.3
46	الوصف والتعريف المظهري للعزلات الفطرية	-2.3
54	التعريف الجزيئي للعزلات الفطرية	-3.3
55	دراسة تأثير درجة الحرارة ونوع وسط الزرع على نمو الفطريات المعزولة	-4.3
55	تأثير نوع وسط الزرع على النمو وعلى إنتاج الأبواغ	-1.4.3
59	تأثير درجة الحرارة على النمو الفطري	-2.4.3
61	اختبار القدرة الإمبراضية لعزلات الـ <i>Fusarium</i>	-5.3
61	اختبار القدرة الإمبراضية على ظهور ونمو غمد الريشة	-1.5.3
66	اختبار القدرة الإمبراضية على الجزء القاعدي لشتلات القمح	-2.5.3
74	اختبار القدرة الإمبراضية على عدد ووزن حبات القمح في السنابل	-3.5.3
81	خاتمة	-4

المحور الثاني

دراسة ضدية بكتيريا المنطقة الجذرية تجاه عزلات الـ *Fusarium*

82	مقدمة	-1
83	الوسائل والطرق	-2
83	المادة النباتية	-1.2
83	المادة البكتيرية	-2.2
84	المادة الفطرية	-3.2
84	دراسة ضدية البكتيريا الجذرية تجاه عزلات الـ <i>Fusarium</i>	-4.2
85	دراسة نشاطية المركبات الطيارة البكتيرية تجاه عزلات الـ <i>Fusarium</i>	-5.2
86	تأثير البكتيريا الجذرية على انبات كونيديات الـ <i>Fusarium</i>	-6.2
86	دراسة المكافحة الحيوية في المخبر " <i>In vitro</i> "	-7.2
88	دراسة المكافحة الحيوية في الدفيئة " <i>in planta</i> "	-8.2
88	توضيح آلية العدائية البكتيرية للممرضات الفطرية	-9.2
88	إنتاج سيانيد الهيدروجين (HCN)	-1.9.2
89	إنتاج أنزيمات هدم الجدار الخلوي الفطري	-2.9.2
89	إنتاج الأميلاز	-1.2.9.2
89	إنتاج البروتياز (Protease)	-2.2.9.2
89	إنتاج السيلولاز (Cellulase)	-3.2.9.2
90	إنتاج البكتيناز (Pectinase)	-4.2.9.2
90	إنتاج الكيتيناز (Chitinase)	-5.2.9.2

90	تعريف العزلات البكتيرية.....	-10.2
91	فحص البكتيريا الجذرية من جهة نشاطها المعزز للنمو النباتي (PGP).....	-11.2
91	اذابة الفوسفات (Phosphate solubilisation).....	-1.11.2
92	إندول-3-حمض الخليك (IAA).....	-2.11.2
92	انتاج الأمونيا.....	-3.11.2
92	انتاج حاملات الحديد (Siderophore).....	-4.11.2
93	تشبيث الأزوت الجوي.....	-5.11.2
93	التحليل الإحصائي للنتائج.....	-12.2
94	النتائج والمناقشة	-3
94	المادة البكتيرية.....	-1.3
94	تأثير العزلات البكتيرية على النمو الشعاعي للميسيليوم الفطري.....	-2.3
98	تأثير المركبات الطيارة على نمو عزلات الـ <i>Fusarium</i>	-3.3
101	تأثير العزلات البكتيرية على انبات الكونيديات الفطرية.....	-4.3
103	دراسة المكافحة الحيوية في المخبر " <i>In vitro</i> ".....	-5.3
105	دراسة المكافحة الحيوية في الدفيئة " <i>in planta</i> ".....	-6.3
108	توضيح آلية العدائية البكتيرية تجاه عزلات الـ <i>Fusarium</i>	-7.3
108	انتاج سيانيد الهيدروجين (HCN).....	-1.7.3
110	انتاج أنزيمات هدم الجدار الخلوي الفطري.....	-2.7.3
110	إنتاج الأميلاز.....	-1.2.7.3
111	انتاج البروتياز (Protease).....	-2.2.7.3
111	أنتاج السيلولاز (Cellulase).....	-3.2.7.3
112	انتاج البكتيناز (Pectinase).....	-4.2.7.3
113	انتاج الكيتيناز (Chitinase).....	-5.2.7.3
114	تعريف البكتيريا.....	-8.3
114	التعريف المظهري.....	-1.8.3
114	التعريف الجزيئي.....	-2.5.3
120	فحص البكتيريا الجذرية من جهة نشاطها المعزز لنمو النباتي (PGP).....	-9.3
120	اذابة الفوسفات (Phosphate solubilisation).....	-1.9.3
122	إندول-3-حمض الخليك (IAA).....	-2.9.3
124	انتاج الأمونيا.....	-3.9.3
124	انتاج حاملات الحديد (Siderophore).....	-4.9.3
127	تشبيث الأزوت الجوي.....	-5.9.3
128	الخاتمة	-4
129	خاتمة عامة	
132	قائمة المراجع	
147	الملحقات	

مقدمة عامة

تعتبر الحبوب عموماً، والقمح (الصلب واللين) والشعير خصوصاً، من أهم المواد انتاجاً واستهلاكاً في العالم عامة وفي الجزائر خاصة، حيث تشير الإحصائيات العالمية إلى أن إنتاج القمح في العالم للموسم الفلاحي 2018-2019 كان حوالي 763 مليون طن (FAO, 2020).

تحتل منتجات الحبوب مكاناً استراتيجياً في كل من النظام الغذائي والاقتصاد الوطني الجزائري، حيث تمثل زراعة الحبوب حوالي 80٪ من المساحة الزراعية المستخدمة في البلاد، تتراوح المساحة المزروعة بالحبوب سنوياً ما بين 3 و3.5 مليون هكتار. تمثل الحبوب، من جهة أخرى، الدعامة الأساسية للنظام الغذائي للمستهلكين الجزائريين حيث أنها توفر أكثر من 60٪ من الاحتياجات الطاقوية ومن 75 إلى 80٪ من الاحتياجات البروتينية من الحصة الغذائية اليومية، كما بلغ استهلاك منتجات الحبوب معدل 205 كغ/الفرد/السنة (Bessouad, 2018).

نظراً للدور الهام للغاية الذي يلعبه القمح (بنوعيه الصلب واللين وكذلك منتجاتهما) في النظام الغذائي للجزائريين، تبذل الدولة مجهودات كبيرة من أجل تحسين انتاج هذا المحصول كما ونوعاً. في السوق العالمية، لا تزال الجزائر أحد المستوردين الرئيسيين للحبوب، وخاصة القمح الصلب والقمح اللين، بسبب ضعف قدرة القطاع المحلي على تلبية الاحتياجات الاستهلاكية المتزايدة للسكان. في الواقع، فإن الإنتاج المحلي للحبوب لا يغطي سوى 30٪ تقريباً، من احتياجات البلاد (Ammar, 2014 ; Bessouad, 2018). وفقاً لـ Hamadache (2002)، فإن السبب الرئيسي لانخفاض الإنتاج هو انخفاض مستوى الإنتاجية (المردود) التي تم الحصول عليها. ترجع هذه الإنتاجية المنخفضة إما إلى أسباب لا حيوية كالظروف البيئية (الجفاف خاصة) أو لأسباب حيوية (الأعشاب الضارة والآفات والأمراض).

يمكن للعديد من الأمراض أن تهاجم القمح، إلا أن عدوى الـ *Fusarium* (Fusarioses) تعتبر هي أكثر الأمراض شيوعاً وتعقيداً، يهاجم هذا المرض جميع أعضاء النبات، من الجذور وحتى السنابل. تعود هذه العدوى أساساً إلى المعقد الفطري المكون من الجنسين *Fusarium* (Burgess et al., 1994) و *Microdochium* (Nielson et al., 2012) الذي ينتج عنه مرض تعفن التاج (FCR-*Fusarium* Crown Root) ومرض لفحة السنابل (FHB-*Fusarium* Head Blight) (Matny, 2015).

تعود الأهمية الاقتصادية لمرض عدوى الـ *Fusarium* إلى ما يسببه من خسائر معتبرة في المردود، من خلال خفض عدد ووزن حبات القمح، ومن خلال خفض جودتها بسبب احتوائها على السموم الفطرية (Mycotoxins) المفرفة من طرف الممرض أثناء تشكلها (Laraba et al. 2017). ترتبط الجودة الصحية للحبوب ارتباطاً وثيقاً بوجود هذه الفطريات وسمومها المفرفة التي تؤثر على صحة الإنسان والحيوان على حد سواء

(Agrios, 2005). في الواقع، من المحتمل أن تؤثر العديد من العوامل على مستوى التلوث بالسموم المفترزة من طرف الـ *Fusarium* ، نذكر من بينها العوامل البيئية، القدرة التسميمية للسلاطات، مدى توزع وتواجد اللقاحات الفطرية وكذا حساسية الأصناف النباتية تجاه عوامل الأمراض (Gargouri-kammoun, 2010).

تعتبر حبات القمح المصابة بأنواع الـ *Fusarium* ، أثناء تشكلها داخل السنابل، مخزنا لهذه الفطريات، حيث يمكنها إعادة تشغيل دورة حياة الفطر إذا استعملت كبذور. من أجل ذلك، كثير ما يتم اخضاع عينات من البذور من أجل دراسة جودتها الصحية (المكروبيولوجية) قبل استعمالها (Xu and Nicholson, 2009).

يتم التحكم في الأمراض الفطرية بشكل رئيسي من خلال المبيدات الفطرية الكيميائية. ومع ذلك، فإن هذه الطريقة محدودة في بعض الحالات، بسبب ظهور مقاومة من طرف العوامل المسببة للأمراض أو ظهور سلالات جديدة مقاومة للمبيدات المعروفة، وعدم وجود مبيدات فطريات فعالة بشكل كاف ضد العامل الفطري المستهدف، كما لا يمكن إهمال الآثار الضارة على البيئة. من أجل ذلك وجب البحث عن طرق بديلة للقضاء أو، على الأقل، للحد من انتشار هذه الأمراض (Mnasri et al., 2016).

أفضل طريقة للتحكم في الذبول الفيوزاريومي هي استخدام الأصناف المقاومة من القمح، والتي قد تتعزز فعاليتها ضد الأجناس الممرضة من خلال استخدام الكائنات الحية الدقيقة المعادية. أثبتت بكتيريا المنطقة الجذرية (Rhizospher Bacteria) فعاليتها في المكافحة الحيوية للأمراض الجذرية، ذات المنشأ الفطري، للعديد من المحاصيل (Palazzini et al., 2007). من بين البكتيريا الأكثر استخدامًا كعوامل للتحكم الحيوي، نجد أعضاء جنسي *Bacillus* و *Pseudomonase*. تؤثر هذه الأنواع على التفاعلات بين العوامل المسببة للأمراض (الفطريات) والنبات من خلال عدد من الآليات مثل التنافس على العناصر الغذائية الأساسية، أو إنتاج مضادات مسببات الأمراض الفطرية أو تحفيز جهاز المقاومة في النباتات (Khan et al., 2018).

نظرا لقلّة الأبحاث في الجزائر حول أنواع الـ *Fusarium* الموجودة في القمح ومدى قدرتها الامراضية من جهة وطرق المكافحة والحد منها من جهة أخرى فإن هذه الدراسة تهدف الى:

- البحث عن مدى احتواء بذور القمح (من مناطق مختلفة) على أنواع الـ *Fusarium*، من خلال عملية العزل والتعريف.
- دراسة القدرة الامراضية لمختلف العزلات المتحصل عليها من عملية العزل والتعريف على كل من بذور، شتلات و سنابل القمح.
- البحث عن بعض العزلات البكتيرية من جنسي *Bacillus* و *Pseudomonas* في المحيط الجذري للقمح والشعير، التي تتميز بالقدرة العدائية للأنواع الممرضة من الـ *Fusarium*.

- دراسة آلية العدائية من خلال التعرف على مختلف الأنزيمات والمواد المضادة للفطريات التي تنتجها هذه البكتيريا.
- إجراء التعريف الجزيئي للعزلات الفطرية الأكثر إمرضية وكذلك العزلات البكتيرية الأفضل من حيث المكافحة الحيوية ومن حيث تعزيز النمو النباتي.

1-عموميات حول نبات القمح (*Triticum sp*)

يعتبر القمح، في الحضارة الغربية والشرق الأوسط، عنصراً أساسياً في تغذية الإنسان. تم تدجينه في الشرق الأدنى من عشب بري منذ حوالي 10000 عام. يعود استهلاكه إلى بدايات العصور القديمة. ظهرت المزارع الأولى في القرن الثامن قبل الميلاد، في بلاد ما بين النهرين أي دجلة والفرات (العراق الآن)، في منطقة "الهلال الخصيب" (حالياً لبنان، سوريا وجنوب تركيا) أين بقي إلى هذا اليوم القمح البري (Feiller, 2000).

القمح هو نبات عشبي حولي أحادي الفلقة (Monocotyledon) ينتمي إلى جنس *Triticum* من عائلة النجيليات (*Gramineae*)، عبارة عن نوع من الحبوب تعتبر الحبات (البذور) فيها فاكهة جافة تدعى "بيرة" (*caryopse*) وتتكون من بذرة وأغلفة (Fredot, 2012). توجد عدة أنواع من القمح، أما اليوم، يهيمن نوعان من القمح على الإنتاج، هما القمح اللين (*Triticum aestivum*) والقمح الصلب (*Triticum durum*) (Feiller, 2000).

يعتبر إنتاج القمح سهلاً (القمح اللين خاصة) لأنه يتكيف مع أنواع مختلفة من التربة والمناخات حيث يزرع في جميع أنحاء العالم ماعدا المناطق الحارة الرطبة الاستوائية (Clermont, 2010)، كما تمكن الإنسان من استعمال أصناف تتكيف مع بيئات مختلفة ومقاومة للعديد من الأمراض مما جعل من الممكن زراعة القمح في العديد من البلدان. توجد مجموعتان موسميتان تزرعان في المناطق الشمالية وهي: القمح الشتوي والقمح الربيعي، تختلف أوقات الزراعة والحصاد في السنة تبعاً لاختلاف القمح المستعمل (محمد، 2000). يوجد عدد كبير جداً من أصناف القمح المزروعة حول العالم، في الجزائر مثلاً يزرع أكثر من 25 صنف (ITGC, 2018).

ينتمي القمح الصلب (Durum wheat) إلى قسم الأقمح رباعية الصيغة الصبغية، مناسب للمناخات شبه الجافة، يزرع بشكل رئيسي على المروج الكندية وفي البلدان المحيطة بالبحر الأبيض المتوسط، لا يمكن استهلاكه مباشرة وإنما يجب طحنه ومن ثمة يستعمل السميد الناتج بشكل رئيسي لصنع الخبز والمعكرونة (Charvet, 2019)، إضافة إلى ذلك، للقمح استعمالات أخرى في صناعة المواد الغذائية حيث يستخدم في صناعة المعجنات والكعك والحلويات، تستخدم مشتقات الحبوب أيضاً في صناعة العديد من المنتجات غير الغذائية مثل الأدوية والورق والمنسوجات والغراء والمنظفات والدهانات والبلاستيك ومؤخراً، الوقود الحيوي "الوقود الأخضر". تعتمد الجودة التكنولوجية للقمح على صلابته وتكوينه من البروتين والنشا (Feillet, 2000).

- يمكن تقسيم الأنواع المنزرعة حسب عدد الصبغيات الى ثلاث مجموعات هي:
- الأنواع زوجية الصيغة الصبغية وبها 7 أزواج.
 - الأنواع رباعية الصيغة الصبغية وبها 14 زوج.
 - مجموعة الأنواع سداسية الصيغة الصبغية وبها 21 زوج (محمد، 2000).

2- الخصائص المورفولوجية

تتمثل الأجزاء الرئيسية لنبات القمح الكامل النمو من الجذور والساق والأوراق والقمة (النورة أو السنبله).

1.2-المجموع الجذري (الجزء القاعدي)

يمتلك نبات القمح نوعين من الجذور، ابتدائية وثانوية. تنمو من ثلاثة إلى ثمانية جذور ابتدائية، تنشأ ابتداء من الجذير، تمتد حوالي 3,5 إلى 15 سم تحت سطح التربة، وتعيش هذه الجذور عادة طيلة حياة النبات إلا إذا أصيبت بضرر، كما أن بترها يؤثر سلباً في النمو وفي كمية المحصول. عندما يبدأ الساق في النمو خارجاً من التربة، فإن الجذور الثانوية (التاجية) تتكون تحت السطح مباشرة انطلاقاً من العقد السفلية الموجودة تحت الأرض للساق الأصلية والفروع القاعدية القريبة من سطح التربة، وهي أكثر سمكاً ومتانة وانتشاراً من الجذور الابتدائية، وهي التي تقوم بالوظيفة الأساسية للجذور من امتصاص الماء والغذاء وتثبيت النبات بإحكام في التربة، يقع معظم المجموع الجذري في الطبقة العليا من التربة. وإذا كانت التربة خفيفة وخصبة، فقد ينتشر المجموع الجذري لعمق يبلغ 210 سم. يطلق على مجموعة السيقان الأرضية وما عليها من عرضية في نبات القمح وغيره من النجيليات اسم التاج (Crown) أو الجذور التاجية (محمد، 2000).

2-2- الجزء الهوائي

1.2.2-الساق

عبارة عن أسطوانة ذات سلاميات (Internodes) ممتلئة (في القمح الصلب خاصة) بنخاع لين وكذلك من عقد (Nodes) مصمتة، تغلف السلاميات بأغمد الأوراق التي تقوم بحمايتها وتدعيمها (Soltner, 2016)، يختلف الطول النهائي للساق باختلاف الصنف والبيئة إلا أنه يتراوح عموماً بين 60 و 150 سم، معظم نباتات القمح لها ساق رئيسية وعدة سيقان فرعية تسمى خُلفات (أشطاء) تنشأ من البراعم الإبطية الموجودة عند العقد التاجية (أسفل سطح التربة مباشرة) (محمد، 2000).

2.2.2- الأوراق

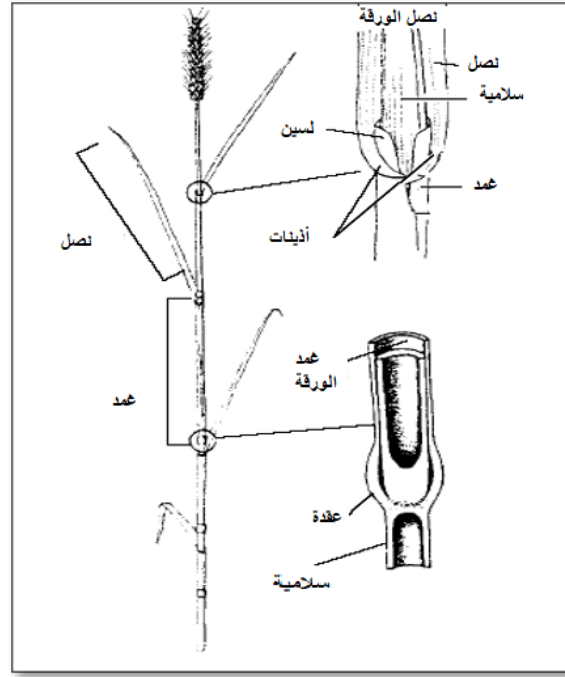
الأوراق الخضرية في القمح مرتبة بالتبادل على الساق في صفين متقابلين، لكل ورقة في نبات القمح غمد (Sheath) ونصل (Blade) و لسين (Ligule) (kirby, 2000). يلتفت الغمد حول الساق، أما النصل الطويل المسطح الرفيع فيمتد من قمة الغمد وينتهي بطرف مستدق، يختلف لون الورقة الخضرية الأولى عن بقية الأوراق، ينشأ عن اتصال الغمد بالنصل ما يعرف باللسين الذي يحيط بالساق في هذا الموضع (شكل 1) (kirby, 2002).

3.2.2- القمة (النورة أو السنبله)

تسمى قمة نبات القمح السنبله (Spike)، وتتكون في أعلى كل ساق رئيسية وخلفة (شطف). وتتركب السنبله من ساق متعددة المفاصل على شكل متعرج تسمى محور الساق (Rachis) التي تحمل مجاميع من الأزهار (تحتوي على الجهاز التكاثري الذكري والأنثوي أين يكون التلقيح ذاتيا) تسمى السنبيلات (Spikelet) التي تتفرع عند كل مفصل وتكون محمولة على السلاميات أو الفقرات (Rachilla)، تغطي هذه الأخيرة بغلاف يسمى القنبعة (Glume)، تحتوي كل سنبله أولية على حبة قمح مغلقة في قشرة. ولكثير من أنواع القمح شعر خشن صلب يسمى الحسك أو السفا يمتد من السنبيلات. وتحمل سنبله القمح النموذجية من 30 إلى 50 حبة (Soltner, 2016) (شكل 2).

4.2.2- الحبة

يبلغ طول حبة القمح عادة من 3 إلى 9 ملم، ذات سطح أملس إلا على قممها حيث توجد خصلة من الشعر القصير، يوجد على سطح الحبة (وجهها) مجرى وسطي يمتد من قمة الحبة الى قاعدتها، تتكون الحبة من ثلاثة أجزاء رئيسية هي: النخالة، والسويداء، والجنين (محمد، 2000). فالنخالة أو غطاء البذرة تغطي سطح الحبة وتتكون من عدة طبقات، وتُشكل ما يبلغ حوالي 14% من الحبة. وفي داخل النخالة توجد السويداء والجنين. وتُشكل السويداء الجزء الأكبر من الحبة، أي حوالي 83%. أما الجنين، وهو جزء البذرة الذي ينمو إلى نبات جديد بعد زراعتها، يتواجد في قاعدة الحبة على الجانب المقابل للمجرى، فيكون 3% فقط من الحبة، يتكون من أعلى من محور قصير ينتهي بالريشة (plumule) التي تتكون بدورها من ورقتين أو ثلاث أوراق خضرية أولية تحيط بالقمة النامية في نهاية المحور، يغلف الريشة غمد مخروطي الشكل يسمى غمد الريشة (Coleoptile)، يتكون الجنين من الأسفل من الجذير الذي يغلف بغمد يسمى غمد الجذير (Coleorhiza) (شكل 3) (Setter and Carlton, 2000). من الناحية الكيميائية تختلف نسب المكونات من نوع إلى آخر إلا أن حبة القمح تتكون أساسا من النشا و البروتين و سكريات مختلفة و كذلك الدهون و المواد المعدنية بنسبة ضئيلة و الماء (جدول 1).



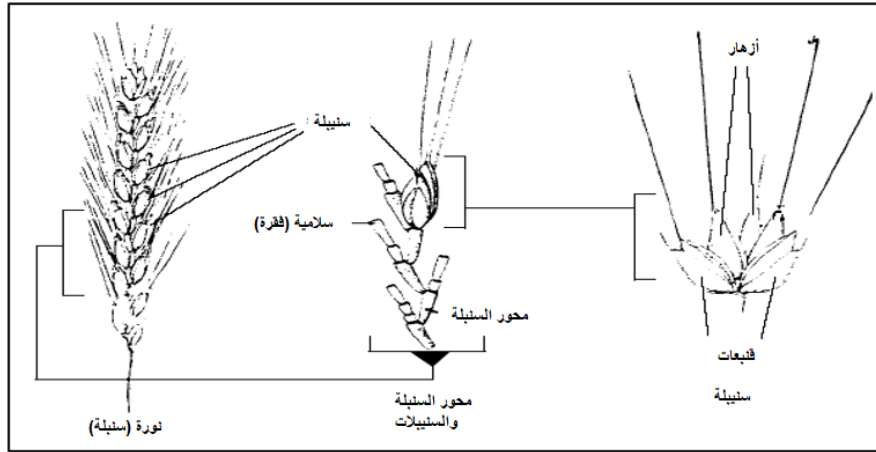
شكل 1. بنية الساق و الأوراق في نبتة قمح ناضجة. (Setter and Carlton, 2000).

جدول 1. التركيب الكيميائي لحبة القمح (Feillet, 2000)

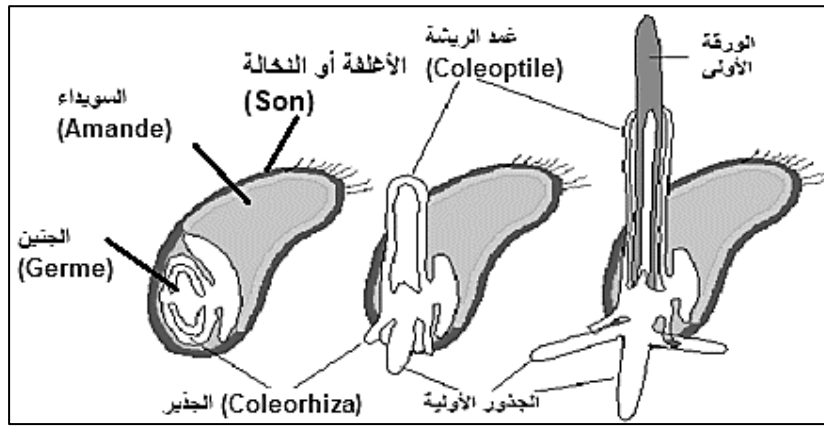
النسبة المئوية	المكون
68,9	النشا
13,7	البروتين
2,7	الدهون
2,4	السكريات المرجعة
7,4	السكريات الخماسية
2,8	السيليلوز
1,9	المعادن

3- أهمية إنتاج القمح

تلعب الأغذية المصنوعة من القمح دوراً أساسياً في التغذية عند جميع شعوب العالم عامة والشعب الجزائري خاصة. مثلاً، الخبز، الكعك والمعكرونة، وكذلك العديد من الوجبات الغذائية الأخرى مثل الكسكس هي أكثر الأطعمة الشعبية المحضرة من القمح في الجزائر (Kezih et al., 2014).



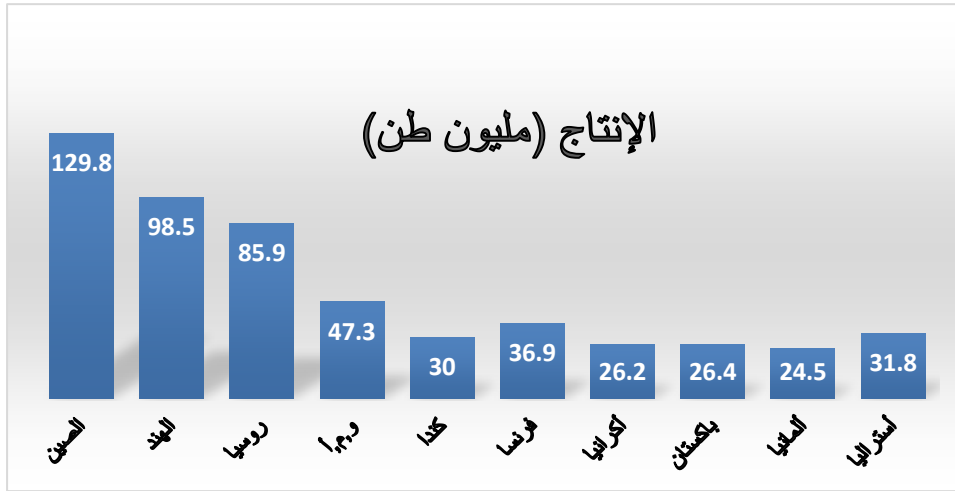
شكل 2. بنية سنبلية القمح مع توضيح بنية السنبليات (Setter and Carlton, 2000).



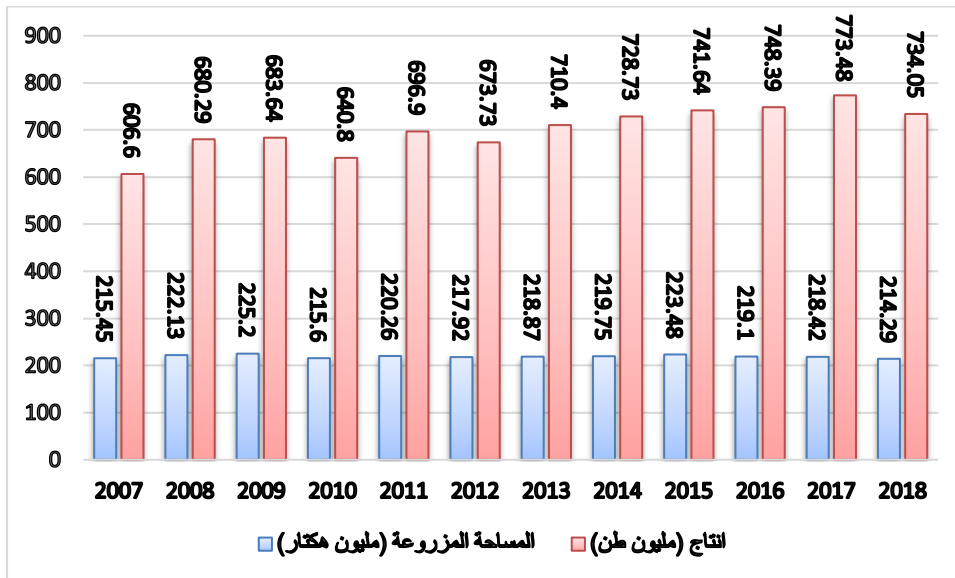
شكل 3. رسم تخطيطي لمكونات حبة وجنين القمح ودورها في عملية الإنبات. (Moule, 1971).

1.3- أهمية إنتاج القمح في العالم

يعتبر القمح أهم الحبوب إنتاجاً بعد الرز والذرة، يتم إنتاجه في مناطق مختلفة من العالم بمساحة إجمالية عالمية تقدر بـ 218 مليون هكتار وإنتاجية قدرت بأكثر من 771 مليون طن سنة 2017 (شكل 5)، كما أن الإنتاج يتركز في مناطق جغرافية معينة نذكر منها أهم الدول المنتجة والمصدرة للقمح وهي الصين والهند وروسيا والولايات المتحدة وفرنسا وأستراليا وكندا وباكستان وأكرانيا وألمانيا (شكل 4) (FAOSTAT, 2018).



شكل 4. الدول العشر الأكثر إنتاجا للقمح سنة 2017. (FAOSTAT, 2018).

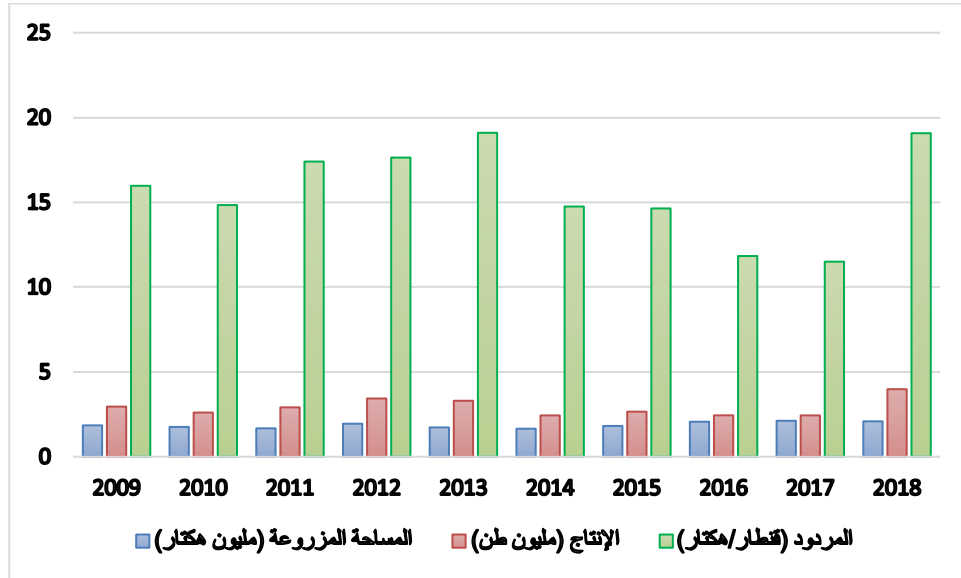


شكل 5. المردود العالمي والمساحة المزروعة من القمح في الفترة بين 2007 و 2018. (FAOSTAT, 2018).

2.3- أهمية إنتاج القمح في الجزائر

تحتل منتجات الحبوب في الجزائر مكانة استراتيجية من ناحية التغذية والاقتصاد الوطني (Djermoun, 2009). يمثل القمح خصوصا القاعدة الأساسية للنظام الغذائي بالنسبة للمستهلك الجزائري (Ammar, 2014) بما يقارب 600 غ للفرد يوميا (Abis, 2012). أنتجت الجزائر ما مقداره 4 مليون طن من القمح سنة 2019 بزيادة قدرت بـ 1,2 مليون طن عما تم إنتاجه سنة 2017 (FAO, 2019). تبقى الجزائر من بين الدول المستوردة لهذه المادة المهمة رغم السياسة المنتهجة من أجل خفض الاستيراد (تقليص الواردات بأكثر من مليون طن سنة 2018) (FAO, 2018) وهذا بسبب المردود الضعيف وغير

الكافي من جهة وبسبب الاحتياجات الاستهلاكية المتزايدة بالموازاة مع النمو الديموغرافي المتزايد (شكل 6).



شكل 6. تطور كل من المساحة المزروعة، المردود وإنتاج القمح في الجزائر خلال الفترة الزمنية (2009-2018) (FAO, 2018).

4- العوامل المحددة لإنتاج القمح

1.4- المحددات البيئية

يتحدد محصول القمح في كثير من الأحيان بالظروف البيئية كما يتعرض لعدد كبير من الإجهادات الحيوية واللاحوية. تكون الإجهادات اللاحيوية التي تحد من مردودية القمح عادة ذات طبيعة مناخية مثل الصقيع، درجات الحرارة المرتفعة والجفاف، أو ذات علاقة بالتربة مثل حموضة التربة (Zahri et al., 2013).

2.4- المحددات الحيوية

يمكن أن يهاجم القمح في عدة مراحل من تطوره من طرف عدة عوامل مضرّة كالأعشاب الضارة مثل نباتي الخرفار الصغير (*Phalaris minor*) وضرس العجوز (*Rumex dentatus*)، الآفات الحشرية مثل بق الحبوب (Cereal bug) والحيوانية مثل الطيور (العصافير والحمام) والقوارض (الجرذان وفئران الحقول) (Hatchett et al., 2015 ; Chhokar et al., 2007 ; Wedny et al., 2008 ; Stenseth et al., 2003 ; Bomford and Sinclair, 2002).

يهاجم القمح أيضا من طرف عدة عوامل ممرضة ميكروبية كالبكتيريا مثل *Pseudomonas*

Xanthomonas translucens و *syringae* subsp. *syringae* اللذان يسببان مرض لفحة الأوراق (Bacterial leaf blight) ومرض القشر الأسود (bacterial leaf streak) على الترتيب. يمكن للفيروسات أيضا أن تسبب أمراضا لنبات القمح، مثلا يسبب كل من Wheat dwarf و Wheat Streak Mosaic Virus مرض virus Wheat streak mosaic ومرض Wheat dwarf على الترتيب (Kapooria and Ndunguru, 2004 ; Mezzalama, 2012). يمكن أن تسبب الأمراض الناتجة عن الأحياء الدقيقة خسائر معتبرة في المردود وكذلك في نوعية الحبوب وهذا في وجود الظروف البيئية المناسبة للممرض من جهة وعند استعمال سلالات القمح الحساسة من جهة أخرى (Zahri et al, 2013). من بين أهم الأمراض الفطرية نجد مثلا:

- مرض صدأ القمح (Rust)

يصيب هذا المرض عدة أنواع نباتية، خاصة عائلة النجيليات وبالضبط كل من القمح والشعير، وهو عدة أنواع، نجد من بينها الصدأ الأصفر والبنّي، اللذان يسببهما كل من النوعين الفطريين *Puccinia striiformis* و *Puccinia recondita* على الترتيب. تتمثل أعراض النوع الأول في بثور ذات شكل كروي وأصفر أو برتقالي اللون، مرتبة في خطوط على طول الأوراق. يمكن أن تتطور أيضًا على الجانب السفلي من الأوراق، على السنابل وكذلك الحبوب. يمكن أن يسبب خسائر في المردود قد تصل الى 70%. أما بالنسبة للنوع الثاني، فيتميز هذا بظهور بثور بيضاوية أو دائرية ذات لون بني أو برتقالي غامق، ثم تأخذ اللون الأسود في نهاية الموسم. تظهر هذه البثور على الوجه العلوي، كما يمكن أن تظهر على الوجه السفلي، للأوراق. يمكن أن يسبب خسائر في المردود تتراوح بين 5 و 40% حسب نوع القمح (Lamari et al., 2005 ; Sayoud et al., 1999 ; Ezzahiri, 2001).

- مرض تفحم القمح

يصيب هذا المرض القمح اللين والصلب على حد سواء، وهو عدة أنواع، كلها ذات منشأ فطري. من بين هذه الأنواع نجد التفحم العاري (Loose smut) الذي يتسبب فيه النوع الفطري *Ustilago tritici*، ونجد أيضا التفحم المغطى (Covered smut) الذي يتسبب فيه النوع الفطري *Tilletia caries*. يمكن لهذا المرض أن يدمر نسبة كبيرة من المحصول. تحدث العدوى بواسطة البذور الملوث سطحها بأبواغ الفطر أو عن طريق التربة حيث تكمن الجراثيم، وعند توفر الظروف البيئية الملائمة. يترافق إنبات الحبوب مع إنبات جراثيم الفطر التي تخترق القمة النامية للبادرة قبل ظهورها فوق سطح التربة وتنمو داخل أنسجتها حتى تصيب الحبوب بتطفلها داخلها. يستبدل هذا المرض الحبوب (داخل السنابل) بكتلة من الفحم، أو كتل من الأبواغ التي تصيب الزهور المتفتحة للسنابل السليمة (عن طريق الرياح) ثم تنمو داخل السنبل، دون

إظهار أي أعراض. تبدو البذور صحية، لكن عندما تصل إلى مرحلة النضج يتضح أنها مصابة (Ezzahiri, 2001).

- التبقع السبتيوري (Septoria)

يهاجم نوعان من أمراض التبقع نبات القمح وهما مرض البقع السبتيورية (تبقع الأوراق)، الذي يتميز بظهور بقع غير منتظمة الشكل ذات لون بني محمر على الأوراق السفلية وخاصة التي تكون في اتصال مع التربة. أما المرض الثاني فهو تبقع الأوراق والسنابل، الذي يتميز بظهور بقع بيضاوية أو عدسية الشكل ذات لون بني، قد يحيط بها حلقة مصفرة، عند انتشارها تتحد مشكلة نخرا (Necrosis) كبيراً، عندما ينتشر هذا المرض بقوة ينتقل إلى القنبيعات (Glumes) وتظهر عليها بقع رمادية ثم تختفي مخلفة ورائها اللون البني أو ما يشبه الاحتراق. يعتبر الفطر *Septoria tritici* المسؤول عن مرض تبقع الأوراق، أما النوع الفطري *Septoria nodorum* فهو المسؤول عن مرض تبقع الأوراق والسنابل. تنتشر الإصابة بهذا المرض خاصة في المناطق الرطبة. يمكن أن يسبب هذا المرض خسائر في المردود تصل إلى 40% (Ezzahiri, 2001 ; Zahri et al., 2013).

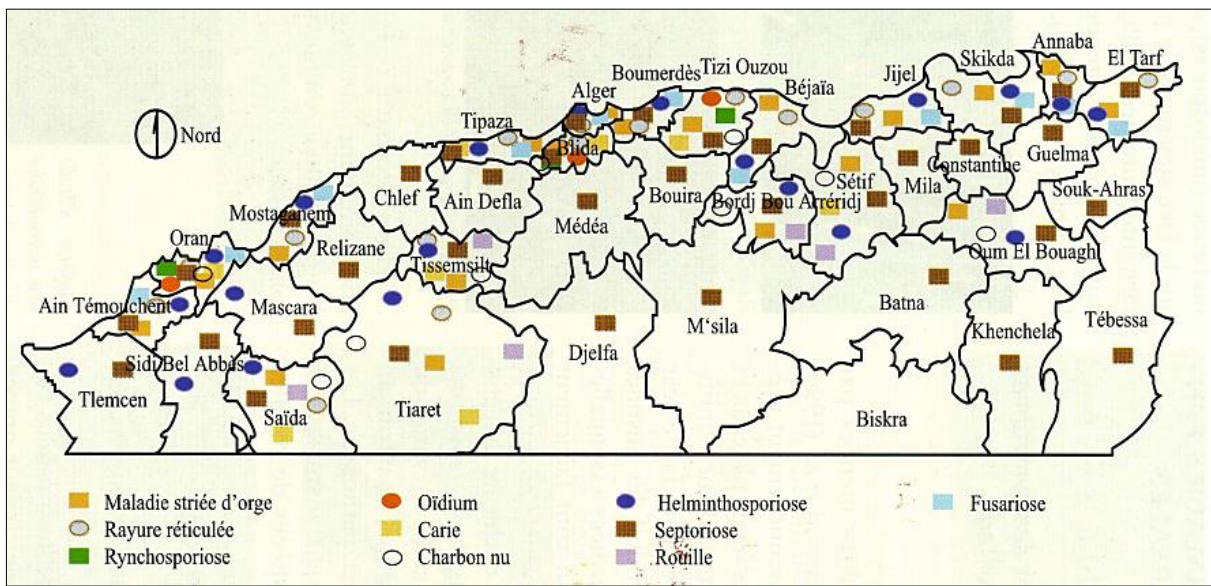
- البياض الدقيقي (Powdery mildew)

يمكن أن يصيب هذا المرض جميع أنواع الحبوب، يعتبر النوع الفطري *Erysiphe graminis f.sp.tritici* هو المسؤول عن هذا المرض في نبات القمح. تتمثل الأعراض في ظهور بقع زغابية المظهر، بيضاء أو رمادية باهتة على الأوراق القاعدية خاصة ثم تتطور على الأوراق من الطبقات العليا. في حال حدوث اصابات شديدة، تظهر الأعراض على أعماق الأوراق وحتى على قنبيعات (أغلفة) السنابل. يمكن للفطر المسبب لهذا المرض مقاومة الحرارة المنخفضة فيبقى مخزناً في التربة طيلة فصل الشتاء، ثم مع دخول فصل الربيع ينمو الميسيليوم وتتشكل الأبواغ بسرعة ما يساعد على الانتشار السريع للمرض (Ezzahiri, 2001 ; Aouali and Douici-Khalfi, 2009).

3.4- وضعية الأمراض ذات المنشأ الفطري في الجزائر

ذكرت كل من Aouali و Douici-Khalfi (2009) من خلال بحثهما حول انتشار وتوزيع الأمراض ذات المنشأ الفطري (شكل 7)، أن جل الأمراض تتواجد في الجزء الشمالي من الجزائر، مع زيادة في التنوع كلما اقتربنا من الولايات الساحلية، حيث تميزت كل من ولاية تيزي، وهران والبلدية بوجود أكثر من خمس أنواع من الأمراض، كما تميزت ولايات أقصى الشمال الشرقي (مثل سطيف، أم البواقي وبرج بوعريريج) والغربي (مثل مستغانم، سعيدة وتيسمسيلت) بوجود أكثر من أربع أنواع من الأمراض.

توصلنا من جهة أخرى، الى أن مرض التبقع السببوري تواجد في كل ولايات الشمال الجزائري، يتبعه مرض التبقع الهلمنتوسبوري الذي وجد في 20 ولاية ومرض من 37 ولاية شملتها الدراسة. تتواجد الأمراض الأخرى مثل أمراض الـ *Fusarium*، التفحم والصدأ بنسب أقل قدرت بـ 11، 8 و6 ولايات من 37 ولاية. أما مرض البياض الدقيقي فلم يتواجد الا في ثلاث ولايات من 37 ولاية (شكل 8). درست Abdallah وآخرون (2019)، توزع مرضي تعفن التاج (FCR) ولفحة السنبل (FHB) اللذان تسببهما أنواع من جنس الـ *Fusarium*، فوجدت أن الأول يتواجد في 19 ولاية من أقصى الشمال الجزائري. أما النوع الثاني فيتواجد في 12 ولاية فقط.



شكل 7. توزيع انتشار الأمراض ذات المنشأ الفطري التي تصيب نبات القمح في الشمال الجزائري (Aouali and Douici-Khalfi, 2009).

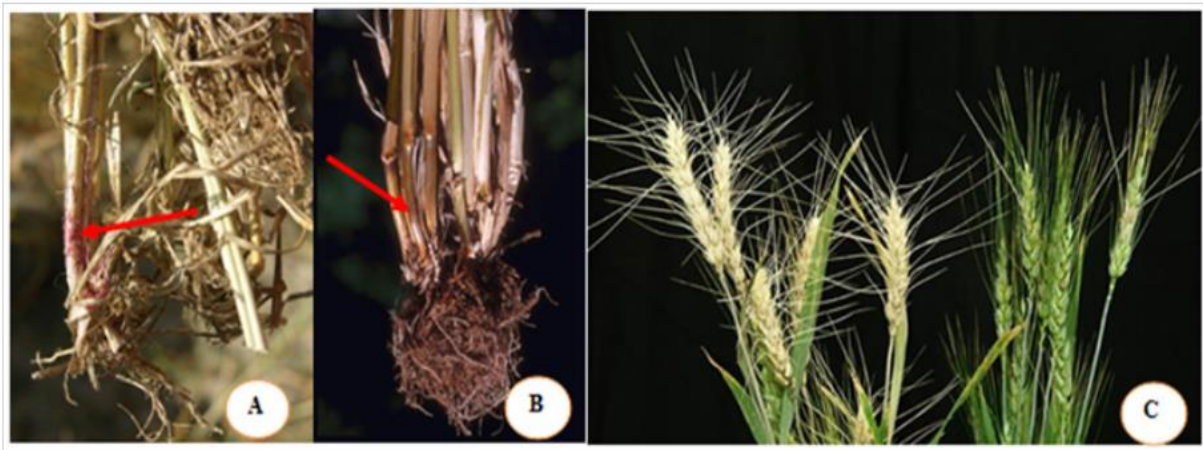
5-أمراض الذبول الفيوزاريومية في القمح (*Fusarium wilt diseases in wheat*)

تعتبر هذه الأمراض من بين أكثر الأمراض خطورة على القمح حيث يمكنها خفض المردود من خلال تخفيض قدرة البذور على الإنبات، تخفيض عدد الحبات في السنبل (Mnasri et al., 2016) وكذلك تخفيض وزن الحب (Hare et al., 1999)، كما يؤثر من جهة أخرى على الجودة الصحية للحبوب من خلال إنتاج السموم الفطرية التي يمكن أن تنتقل إلى السنابل وتتراكم في الحبوب المتشكلة. تكون البذور المنتجة صغيرة الحجم وذات مظهر أبيض شاحب مع احتواء منخفض على البروتين، تتلوث الحبوب المصابة أيضا بالسموم الفطرية ما سيؤدي إلى تلوث المنتجات المصنعة من هذه الحبوب وبالتالي التأثير على صحة المستهلك (Matny, 2015)، النتائج الاقتصادية لهذا المرض معتبرة حيث سجل على سبيل

المثال في الولايات الشمالية والوسطى للولايات المتحدة في الفترة بين 1998 و2000 خسائر قدرت بـ 2,7 مليار دولار (Nganje *et al.*, 2001). المرضان الرئيسيان الناجمان عن جنس الـ *Fusarium* على القمح هما مرض تعفن التاج أو *Fusarium Crown rot* (FCR) ومرض لفحة السنابل أو *Fusarium Head blight* (FHB)، المعروف أيضاً باسم الجرب (Scab) (Matny, 2015).

1.5- مرض تعفن التاج (FCR)

الـ FCR هو مرض مهم من الناحية الصحية والاقتصادية يصيب القمح في جميع أنحاء العالم. يمكنه مهاجمة النباتات في معظم مراحل النمو مسبباً النخر (Necrosis) والتعفن الجاف (Dry rot) لقاعدة التاج التي تتلون عادة باللون البني (Backhouse *et al.*, 2004). تختلف أعراض المرض وفقاً لوقت الإصابة حيث تحفز المراحل المبكرة للعدوى الموت قبل أو بعد ظهور الشتلات مع تلون غمد الريشة (Coleoptile) بالبني؛ تحفز المراحل المتأخرة من العدوى تلويح السلاميتان أو الثلاث الأولى بالبني، إذا كان الهجوم خطيراً، تنتشر السنابل المحترقة (البيضاء) في الحقل ويمكن مشاهدتها بسهولة عندما تكون نباتات القمح لا تزال خضراء (Abdellah *et al.*, 2019). من الأعراض البارزة لهذا المرض السنابل البيضاء (Dead heads)، التي تكون ذابلة أو بدون حبوب. يمنع العامل الممرض النقل المائي عبر الساق ما يحفز ظهور السنابل البيضاء. قد يتشكل غزل فطري وردي اللون على أعغام الأوراق (leaf sheaths) وعلى العقد السفلية خاصة أثناء الطقس الرطب (الشكل 8)، (Hollaway and Exell, 2010).



شكل 8. مختلف الأعراض والعلامات لمرض تعفن التاج (FCR) في القمح.

(A و B) ميسيليوم فطري ذو لون وردي/أحمر وزوال اللون الطبيعي لقاعدة الساق. (C) الرؤوس أو السنابل البيضاء: إلى اليسار السنابل المصابة (Matny, 2015).

ينجم هذا المرض عن عدة أنواع من جنس الـ *Fusarium* مثل *F. culmorum* و *F. pseudograminearum* وهما المسببان الشائعان بينما *F. graminearum*، *F. crookwellense* و *F. avenaceum* هي مسببات ممكنة (Touati-Hattab *et al.*, 2016; Matny, 2015).

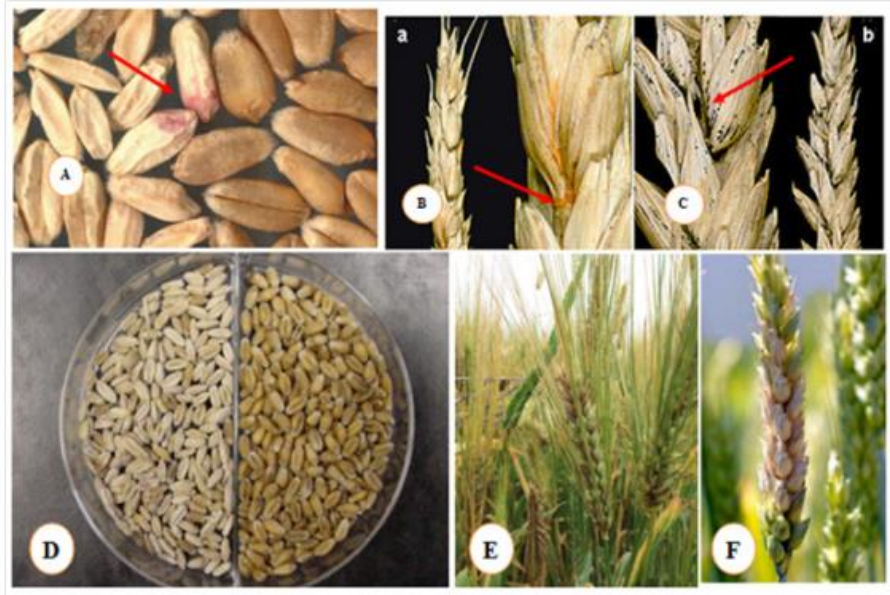
2.5- مرض لفحة السنابل (FHB)

عبارة عن مرض مدمر للقمح حيث يمكنه تدمير الحقول عدة أسابيع قبل حصادها. يكون مصحوبا في الغالب بخسائر معتبرة في المردود (اجهاض وانخفاض وزن الحب)، انخفاض جودة الانبات وكذلك الجودة الغذائية بسبب تراكم السموم الفطرية (Balmas *et al.*, 2015)، تعتبر هذه الأخيرة خطيرة جدا على صحة الإنسان والحيوانات الأليفة (Parry *et al.*, 1995 ; Agrios, 2005)، عموما يمكن تقسيم السموم الفطرية التي ينتجها جنس الـ *Fusarium* الى ثلاث مجموعات: المجموعة التي يمثلها Zearalenone (ZEA) ومجموعة Trichothecenes (مثل DON و NIV) ومجموعة Fumonisin (Agrios, 2005). تتلف السموم الفطرية، إضافة الى تأثيرها على الصحة، الجودة الفيزيائية والتكنولوجية للمنتجات المصنعة انطلاقا من حبوب مصابة (Duc and Bezet, 2003).

إضافة الى القمح، يمكنه أيضا أن يتواجد في العديد من النباتات مثل الشوفان، الشعير، الأرز، الذرة، الأكاسيا والقرنفل وغيرها مما يجعله مرضا ذا تأثير زراعي-اقتصادي قوي جدا على المستوى العالمي، حيث تم العثور على الفطريات من جنس *Fusarium* في تربة كل القارات باستثناء القارة القطبية الجنوبية (Miedaner, 1997)

عادةً، الأعراض الأولى الملاحظة هي تبيض (احتراق) بعض أو كل السنبيلات (spikelets) في الوقت الذي لا تزال السنابل السليمة خضراء. بينما تنتقل الفطريات في محور السنبلة (Rachis)، السنبيلات العلوية والسفلية لمركز الإصابة تصبح بيضاء (محترقة) أيضا. في وجود الرطوبة، يمكن أن تُلاحظ كتل من الأبواغ الفطرية ذات لون وردي الى برتقالي على السنبيلات المصابة (شكل 9). عموما تساعد الأجواء الرطبة والدافئة على نمو وانتشار المرض (Matny, 2015).

يتسبب في هذا المرض بشكل رئيسي عدة أنواع من الـ *Fusarium* مثل *F. graminearum* (*Gibberella Zeae* الطور الجنسي)، *F. poae*، *F. culmorum*، وكذلك *F. avenaceum* (Snijders, 1994 ;)، يمكن أن يسبب هذا المرض أنواع أخرى مثل: *F. langsethiae* (Boutigny *et al.*, 2011) و *Microdochium nivale* (المعروف سابقا بـ *F. nivale*) (Parry *et al.*, 1995 ; Xu *et al.*, 2005).



شكل 9. أعراض مرض لفحة السنابل (FHB) على القمح. (Matny, 2015).

(D و A) حبوب صغيرة، ذابلة، ذات مظهر شاحب وفي بعض الأحيان وردي (المصابة الى اليسار والسليمة الى اليمين).
(B و C) تكتلات بوغية (Sporodichia) ذات لون برتقالي، تشكل الأجسام الزقية (Perithecia) ذات اللون الأسود
المزرق في قاعدة القنبعة (Glume). (F و E) تبيض مبكر للسنبيلات المصابة (Matny, 2015).

3.5- العامل المسبب " مجموعة الـ *Fusarium* " (*Fusarium Complex*)

1.3.5- التصنيف

1.1.3.5- الأشكال المشتبهة (Anamorphs)

يضم جنس الـ *Fusarium* الفطريات الناقصة (imperfect fungi) أو الفطريات المشتبهة (anamorphic fungi) والتي يكون تكاثرها لاجنسيا عن طريق كونيديات (Conidia) ذات أشكال وترتيبات جد متنوعة تستعمل في التصنيف (Boucher et al., 2000). يصنف الـ *Fusarium* (الأشكال المشتبهة) ضمن قسم الفطريات الناقصة (Deuteromycota)، صف Hyphomycetes، رتبة Tuberculariales، وعائلة Tuberculariaceae (Botton et al., 1985).

2.1.3.5- الأشكال الكاملة (Teleomorphs)

هي الأشكال المثالية (perfect form) لجنس الـ *Fusarium* حيث التكاثر الجنسي معروف، تنتمي الأشكال الجنسية (teleomorphs) لعدد من أنواع هذا الجنس الى الجنس *Gibberella* وبعض الأنواع الأخرى الى الجنسين *Nectria* و *Calonectria* (Leslie and Summerell, 2006). تصنف الأشكال الجنسية ضمن قسم الفطريات الكيسية أو الزقية (Ascomycota)، صف Hymenoascomycetes، رتبة

Hypocreales وعائلة Hypocreaceae (Botton et al., 1985). عندما يكون الشكل الكامل والناقص معروفان من الأفضل أن تكون التسمية كالتالي:

Giberrella zae f.c. Fusarium graminearum (f.c = conidial form)، تسمح التسمية المضاعفة بإزالة الغموض (Jeunot, 2005).

2.3.5- تعريف (تحديد) أنواع الـ *Fusarium* المسؤولة عن الذبول الفيوزاريومي

يعد تعريف الأنواع الفطرية المسؤولة عن الذبول الفيوزاريومي أحد الخطوات الأولى لمباشرة أي طريقة لمكافحة هذا المرض. يعتمد تحديد هوية الأنواع التابعة لهذا الفطر منذ زمن طويل على الخصائص المظهرية، فيما يتعلق بالمزارع (الدراسة الماكروسكوبية) أو ما يتعلق بالميسيليوم والأبواغ (الدراسة المجهرية).

1.2.3.5- التشخيص المظهري (Morphological identification)

يسمح التشخيص المظهري بمعرفة الجنس، لكن التفريق بين الأنواع يكون صعبا ويعتمد على عدة معايير أولية وثنائية، تتضمن المعايير الأولية شكل الكونيديات الكبيرة (Macroconidia)، وجود أو غياب الكونيديات الصغيرة (Microconidia) وكذلك شكلها، تشكيل أو عدم تشكيل سلاسل الكونيديات الصغيرة. أما المعايير الثانوية فتعتمد على وجود أو غياب الأبواغ الكلاميدية (Chlamydospore) كذلك شكلها وتوضعها كما تعتمد على وجود أو غياب الوسائد الجرثومية (Sporodochia) أو الأجسام الحجرية (Sclerotia) (Wagacha and Muthomi, 2007). أظهر Burgess وآخرون (1994) في دراسة أجراها حول أنواع الـ *Fusarium* أن شكل المستعمرات ولونها لا يكون مفيدا في التشخيص إلا إذا تم العمل في الشروط القياسية.

يتطلب التشخيص المظهري لأنواع جنس الـ *Fusarium* زراعة العزلات على أوساط زرع مختلفة، أكثر الأوساط استعمالا هي (PDA) Potato Dextrose Agar، (SNA) (CLA) Carnation Leaf Agar، (Kammoun-Gargouri, 2010).

2.2.3.5- التشخيص الجزيئي (Molecular identification)

على اعتبار صعوبة التشخيص المظهري، أصبح التشخيص الجزيئي، شيئا فشيئا، أكثر استعمالا. يعتمد التشخيص الجزيئي عموما على التضخيم بتقنية الـ PCR (Polymerase Chain Reaction) لأجزاء محددة من المادة الوراثية (Hsu et al., 2003). تتميز هذه التقنية ببساطتها، سرعتها وحساسيتها القصوى مع قدرتها العالية، نظريا، على التعرف على جزيئة مستهدفة واحدة (Edwards et al., 2002). توجد عدة

أزواج بادئات (Primers) متخصصة من أجل التشخيص الدقيق لأنواع الـ *Fusarium* التي لها علاقة بأمراض الذبول الفيوزاريومي، كما تم تصنيع عدة أزواج بادئات خاصة بالأنواع *F. graminearum* و *F. pseudograminearum* و *F. culmorum* و *F. avenaceum* وأنواع أخرى من الـ *Fusarium* (Kammoun-Gargouri, 2010). من بين أهم أزواج البادئات المستعملة نجد: ITS1 و ITS4 و (Internal Transcribed Spacer) وكذلك EF-728F (Elongation factor) (جدول 2).

من جهة أخرى توجد عدة قواعد للبيانات من أجل تشخيص وتعريف أنواع الـ *Fusarium* أهمها قاعدة المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI National Center for Biotechnology Information)، يمكن مقارنة نتائج دراسة التتابع (sequencing) للمورثات ITS و EF مع التسلسلات الموجودة في بنك المعلومات الجينية (GenBank) من أجل معرفة النوع المدروس (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

جدول 2. أهم البادئات المستعملة في التعريف الجزيئي لأنواع الـ *Fusarium*.

المرجع	التتابع (التسلسل)	زوج البادئة
Gardes and Bruns (1993)	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	ITS1-F
White <i>et al.</i> (1990)	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	ITS4
Carbone and Kohn (1999)	5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'	EF-728E
Geiser <i>et al.</i> (2004)	5'-ATGGGTAAGGA(A/G) GAGAAGAC-3'	EF1
O'Donnell <i>et al.</i> (1998)	5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3'	EF2

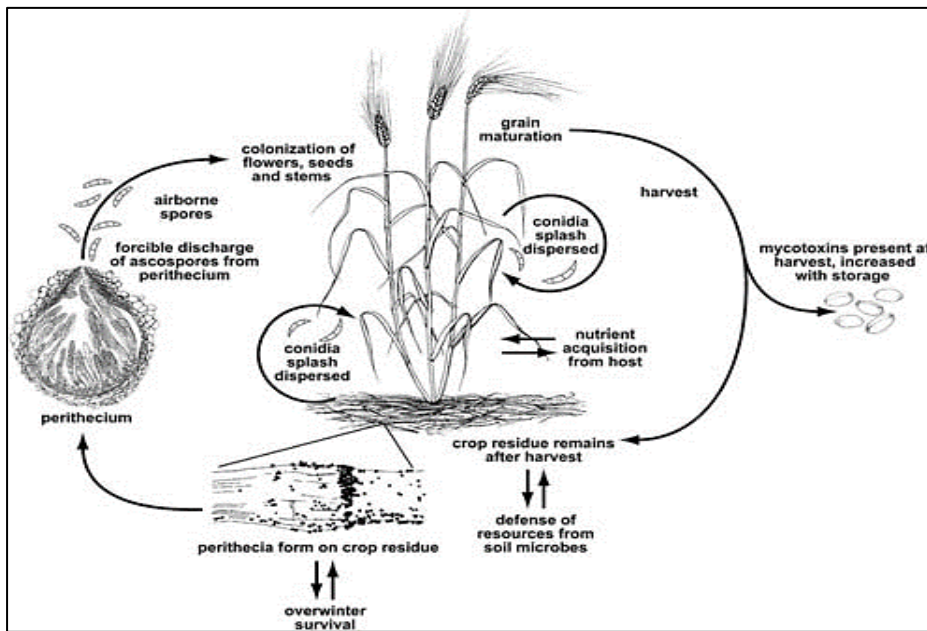
3.3.5- دورة الحياة

1.3.3.5- اللقاح الأساسي (Primary inoculum)

يمكن تلخيص دورة حياة العامل المسبب للمرض في الشكل 10 عن طريق استعمال دورة حياة *F. graminearum* كنموذج. أثناء الشتاء، وخلال كامل دورة المحصول، يبقى العامل الممرض المسبب لمرض لفحة السنابل في التربة على شكل أبواغ كلاميضية (Bai and Shaner, 1994). يستطيع هذا اللقاح (وهو ما يعرف باللقاح الأساسي) إصابة الشتلات ما يؤدي إلى ذبولها (seedling blight) كما يؤدي إلى تعفن التاج (Crown rot) (Arsan *et al.*, 2011). يتكون اللقاح أساساً من الكونيديات الكبيرة أو الصغيرة (الثمار اللاجنسية) والأبواغ الأسكية (الثمار الجنسية) والتي تنتج في الظروف الرطبة والحارة (Xu *et al.*, 2005). تنتشر الأبواغ (الجنسية واللاجنسية) عن طريق الرياح (Fernando *et al.*, 1997) أو عن طريق تناثر قطرات المطر من ورقة إلى أخرى (splashing). تجدر الإشارة أن كل من *F. culmorum* و *F. poae* لا يتكاثران بالطريقة الجنسية (Doohan *et al.*, 2003).

ثلاث مصادر للقاح يمكن أن تكون سبب تطور المرض:

- بقايا المحصول المصاب في السنة السابقة (المصدر الأساسي) وخصوصا الأنسجة التي تتحلل بصعوبة مثل العقد (Champeil *et al.*, 2004 ; Osborne and Stein, 2007): يمكن للفطريات البقاء على قيد الحياة على البقايا لأكثر من سنتين بعد الحصاد وعليه يمكن تصنيفها على أنها " مصدر طويل الأجل" إذا ظلت البقايا على السطح فإن اللقاح سيعيش لمدة أطول (Pereyra *et al.*, 2009 ; Audenaert *et al.*, 2004). في الجزء الأكثر عمقا في التربة، يمكن للأبواغ الكلاميدية فقط العيش لمدة تصل إلى أربع سنوات، تعيش هذه الأبواغ حياة بطيئة كما تمتلك جدارا سميكاً يمكنها من مقاومة الجفاف والاختناق لمدة طويلة (Caron, 1993).
- البذور المصابة (الملوثة) عندما تحدث إصابة على مستوى السنبل، يهاجم الميسيليوم حبات القمح عن طريق القنبعات (Glumes)، يخترق الأغلفة ويدخل إلى السويداء (Albumen) وحتى إلى الجنين. يسمح هذا المصدر من اللقاح بتطور المرض ابتداء من فصل الخريف القادم. أثناء الإنبات يستعيد الميسيليوم نشاطه ومن ثم يبطن أو يثبط الإنبات، حسب درجة الإصابة الأولية، هذا ما يؤدي إلى غياب ظهور الشتلات (Dumping-off) أو ذبولها (Xu and Nicholson, 2009).
- النباتات المضيفة (Host plants) مثل *Agrostis*، *Bromus*، *Medicago* و *Festuca* وغيرها يمكن أن تلعب دور خزان للـ *Fusarium* دون أعراض ظاهرة (Leonard and Bushnell, 2003 ; Champeil *et al.*, 2004).



شكل 10. دورة حياة *F. graminearum* أهم العوامل المسببة لمرض لفحة السنابل (FHB). (Trail, 2009).

يتعلق نضج الأبواغ بالتفاعلات مع العوامل البيئية؛ يُحفز النضج بالرطوبة، الحرارة والضوء (Guenther and Trail, 2005) ويكبح بالجفاف وبيرودة الشتاء (Champeil *et al.*, 2004). تنبت الأبواغ بعد ذلك على سطح المضيف (Host) عندما تكون الظروف مناسبة. تضم هذه الظروف الرطوبة العالية (>90%) مدة 48 إلى 72 ساعة في ظل الظروف الخاضعة للمراقبة ومن 4 إلى 5 أيام في الظروف الطبيعية، وفي حرارة بين 15 و30م° (Bai and Shaner, 1994 ; De Wolf *et al.*, 2003 ; Gilbert *et al.*, 2008). إذا ما انقطعت الفترات الملائمة أو تعدت درجة الحرارة 30م° فإن الإنبات ممكن ولكن مع فعالية الإصابة تكون أقل.

2.3.3.5- انطلاق المرض وتطور الفطر

ينطلق مرض لفحة السنابل عن طريق توضع الأبواغ الناضجة على سنابل القمح قيد الإزهار. تنبت هذه الأبواغ، يستعمر الميسيليوم الناتج المآبر المخرجة، عموماً في المنطقة الوسطية للسنبلة، أين تبدأ مرحلة الإزهار وأين تكون الرطوبة أعلى من باقي السنبيلات (Walter *et al.*, 2009 ; Leonard and Bushnell, 2003). يدخل الميسيليوم إلى الزهرة ويتطور فيندمج في الحبة، التي تكون قيد التكون، أغلفة الأزهار ومن ثم محور السنبلة. يمكن أن يتم الدخول إلى السنبلة عن طريق سطح القنبعات أو عن طريق الفحات الطبيعية (الثغور، الجروح) (Brown *et al.*, 2010 ; Champeil *et al.*, 2004). في المرحلة الأولى، تتطور الهيفات (Hyphae) المتبرعمة على سطح الحبة مشكلة شبكة كثيفة من الهيفات داخل السنبلة وكذلك حول المبيض 24 إلى 26 ساعة بعد التلقيح (Brown *et al.*, 2010). بعد ذلك، في مقدمة الإصابة، يتطور الفطر بين الخلايا ويتغذى على الإفرازات خارج خلوية لكن دون أن تظهر إلى بعد أية أعراض (Guenther and Trail, 2005). خلف مقدمة الإصابة، تتقدم الهيفات وتتطور في الأنسجة الحية للمضيف محفزة الاستعمار داخل خلوي مسببة موت خلايا العائل عن طريق النخر (Necrosis)، تترجم هذه الأحداث بظهور أولى أعراض زوال اللون الطبيعي أو ما يعرف بـ "التبييض" (Bleaching) 2 إلى 4 أيام بعد الإصابة. يمكن أن تتصاحب أعراض النخر أيضاً ببقع بنية على القنبعات ومحور السنبلة (Christ *et al.*, 2011 ; Bottalico and Perrone, 2002). ينتقل المرض بعد ذلك عبر محور السنبلة مستعمراً السنبيلات المجاورة وبشكل أقل الأبعد فالأبعد (Argyris *et al.*, 2005). يؤدي هذا الانتشار في محور السنبلة إلى الاختلال الوظيفي للجهاز الوعائي والذي يكون مرتبطاً بالنضج المبكر للجزء العلوي لمنطقة الإصابة من السنبلة (الاحتراق) (شكل 11). إذا حدثت الإصابة في وقت مبكر من دورة نمو القمح، يمكن في هذه الحالة أن تختفي الحبات نهائياً أو أن تكون ضامرة بسبب انعدام وصول الغذاء والماء (Bai and Shaner, 1994 ; Leonard and Bushnell, 2003). يمكن بعد ذلك أن تتشكل أبواغ جنسية ولاجنسية على سطح أجزاء النبات المصابة أو حتى على بقايا المحصول عندما تكون الرطوبة عالية

(Vogelgsang *et al.*, 2008). الأعراض الظاهرة على الحبات متنوعة جدا (شكل 12). إذا ما حدثت الإصابة قبل تشكل الحبات فإن هذه الأخيرة تتأثر بشكل كبير وقد تختفي تماما (Bai and Shaner, 1994)، تكون الحبات المصابة صغيرة جدا وذات لون أبيض أو وردي حسب تطور الميسيليوم، ذات مظهر خشن ومجدد يرتبط بشكل كبير بكمية عالية من السموم الفطرية؛ يمكن أيضا مشاهدة بقع سوداء حول الجنين (Christ *et al.*, 2011). عندما يكون الهجوم متأخرًا، يكون للحبوب حجم طبيعي ولكن من المحتمل أن تحتوي على سموم فطرية (Leonard and Bushnell, 2003)، وعليه فإن مرحلة نمو الحبوب مهمة بشكل واضح في تأثير المرض على المحصول.



شكل 11. صورة توضح مراحل ظهور أعراض مرض لفحة السنابل، من اليسار إلى اليمين: ظهور أولى أعراض الإصابة (زوال اللون) 3 أيام بعد الإصابة (أ.ب.إ.)، استعمار السنبيلات المجاورة 5 (أ.ب.إ.)، احتراق الجزء العلوي لمنطقة الإصابة 9 (أ.ب.إ.) (Siou, 2013).



شكل 12. صورة لحبات قمح مصابة حسب مرحلة الإصابة. تم تلقيح السنابل بسلالة *F. graminearum* ابتداء من مرحلة الإزهار (إصابة مبكرة) الى اليسار، حتى 28 يوم بعد الإزهار (إصابة متأخرة) الى اليمين، الحبة الأخيرة الى اليمين مأخوذة من سنبلة غير ملقحة (شاهدة) (Siou, 2013).

3.3.3.5- الظروف الملائمة لتطور المرض

تتقيد حدة المرض بثلاث عوامل مستقلة عن الفطر وهي:

- العوامل البيئية يمكن أن تتداخل عدة عوامل مناخية مع نوع المجمع الفطري المسؤول عن المرض، عن طريق تفضيل أو تثبيط وجود أنواع معينة وكذلك التنافس بينها. تلعب العوامل المناخية، وخاصة الرطوبة ودرجة الحرارة، دورًا مهمًا جدًا لأنها ستحدد مدى إنبات الفطريات وعدوانيتها. لكل نوع ممرض الحرارة والرطوبة الملائمتين واللذان تتعلقان بالمصدر الجغرافي (Xu and Nicholson, 2009 ; Doohan *et al.*, 2003). أثناء كامل الدورة الزراعية، تعزز الرطوبة والرياح بقاء وانتشار اللقاح الأساسي (Alvarez *et al.*, 2009).
- العوامل الزراعية يتمثل دورها الرئيسي في الحفاظ على اللقاح الأساسي المتبقي عن محاصيل سابقة حساسة للمرض (قمح، شعير وذرة) الذي يعتبر مصدر إصابة للمحصول الموالي. إضافة إلى ذلك، يساعد حرث التربة على تفكيك البقايا مما يعزز من النشاط الميكروبي وبالتالي الحد من استعمار بقايا المحصول بهذا الممرض (Pereyra *et al.*, 2004).
- العوامل الفيزيولوجية للنبات المضيف تتعلق حدة المرض، ليس فقط بكمية اللقاح الأساسي وسمية السلالة الفطرية الممرضة، بل كذلك الخصائص الفيزيولوجية للنبات المضيف (الحجم، الكثافة، السننيلات ...)، مرحلة النمو، تاريخ بداية الإزهار ومدته وكذلك مقاومة الصنف المزروع للمرض (Xu *et al.*, 2005 ; Champeil *et al.*, 2004 ; Audenaert *et al.*, 2009). وصف Mesterhazy وآخرون (1999) خمسة أنواع مختلفة من المقاومة لدى المضيف ضد المرض. النوع الأول يتعلق بالمقاومة ضد الإصابة الأولية، النوع الثاني يتعلق بمقاومة تطور المرض في السننلة، يتعلق النوع الثالث بقدرة المضيف على منع تخليق السموم الفطرية أو، بالمقابل، تحفيز هدمها، النوع الرابع يمنع إصابة الحبات أما النوع الخامس فيتعلق بالتحمل ضد الإصابة.

6- طرق ووسائل المكافحة

1.6- المكافحة الزراعية (Agricultural control)

تهدف هذه المكافحة إلى الحد من تطور كمية اللقاح في التربة وتعتمد على:

- استعمال بذور سليمة (Caron, 2003).
- استخدام الأسمدة النيتروجينية بصفة عقلانية (Mauler-Machnik and Suty, 1997).
- التخلص من مخلفات المحاصيل الملوثة عن طريق الحرق أو الدفن العميق (Dill Macky *et al.*, 2000).

- القيام بالتناوب لمدة عامين على الأقل خارج الحبوب (بالتناوب مع البقوليات)، وهذا يقلل من كثافة اللقاح (Gilbert and Tekauz, 2000).
- تسميس التربة (التعقيم عن طريق التعريض ضوء الشمس) تقنية تستخدم في المناطق المشمسة للغاية، تجعل هذه عملية من الممكن التقليل من مسببات الأمراض وحدوثها دون استخدام منتجات الصحة النباتية (Pandy et al., 1996).

2.6- المكافحة الوراثية (Genetic control)

تعتبر السيطرة على الـ *Fusarium* عن طريق اختيار الأصناف المقاومة محدودة بسبب عدم وجود جينات المقاومة في المادة الوراثية النباتية للأصناف المجربة (Mnasri et al., 2016). الأمر الذي يجعل هذا النوع من المكافحة صعبا هو أن اختيار الأصناف يجب أن يأخذ بعين الاعتبار المقاومة ضد الأمراض الأخرى (Yuen and Schoneweis, 2007). رغم ذلك، العديد من أعمال الاختيار أجريت إما باستعمال أصناف القمح البري مثل *T. turgidum ssp. Diccocoides* (Kumar et al., 2007) وإما باستعمال الصنف المستنبت (Cultivar) الصيني Sumai 3 الذي يبدو أنه الأكثر استعمالا في مقاومة مرض لفحة السنابل (Yu et al., 2008).

3.6- المكافحة الكيميائية (Chemical control)

تعتمد هذه الطريقة على استعمال بعض المواد الكيميائية المضادة أو القاتلة للفطريات مثل tebuconazole الذي تبقى فعاليته محدودة وغير كافية ضد التلوث بالسّم الفطري (DON) (Jiménez-Gasco et al., 2004). مؤخرا، ظهر مبيد فطري (fungicide) جديد وهو عبارة عن مركب بين prothicanozoIe وtebucanozole الذي يبدو انه الأكثر فعالية (Köycü, 2019). عموما، من أجل نجاح المعالجة بالمبيدات الفطرية فإن التطبيق المتجانس في الوقت المناسب يعتبر أمرا ضروريا (Yuen, 2007)، كما أن ظهور الأنواع الفطرية المقاومة يبقى دائما العائق الأساسي لنجاح هذه الطريقة في المكافحة.

4.6- المكافحة البيولوجية (Biological control)

أظهرت عدة كائنات دقيقة فعاليتها في حماية القمح ضد أمراض الذبول الفيوزاريومي. الأجناس *Bacillus*، *Agrobacterium*، *Lysobacter* و *Pseudomonas* هي العوامل البكتيرية الأكثر دراسة (Yuen et al., 2007). من جهة أخرى، عدة فطريات من جنس *Sporobolomyces*، *Gliocladium*، *Cryptococcus* و *Trichoderma* يمكنها أيضا تقليل و خفض اللقاح لعدة أنواع من جنس الـ *Fusarium* خاصة

اهتم الكثير من الباحثين بالبحث واستخراج الكائنات الدقيقة من أجل استعمالها في مكافحة الحويية ضد الـ *Fusarium* (Schisler et al., 2006 ; Palazzini et al., 2007). صرح Schisler وآخرون (2006) أن الأنسجة الزهرية للقمح تحتوي على الكولين (Choline) والبيتاين (Betaine) وهما مركبان يحفزان نمو الميسيليوم لدى *Gibberella zea* المسبب الرئيسي لمرض لفحة السنابل. وقد أضاف أن كل سلالة بإمكانها هدم الكولين يمكن استعمالها لمكافحة هذا المرض.

توجهت الدراسة أيضا الى البحث، عن الكائنات الدقيقة المفيدة في مكافحة، في المحيط الجذري أو ما يعرف بالريزوسفير للنبات المدروس (Rhizosphere) وكذلك البحث، داخل الجذور، عن البكتيريا الجذرية الداخلية (Endophytic) (Sanguin et al., 2009; Figueroa et al., 2016; Baffoni et al., 2015). تم الإبلاغ فعلا عن بعض التطبيقات الناجحة للبكتيريا المعزولة من للتربة أو من الريزوسفير كعوامل للتحكم البيولوجي ضد مرض لفحة السنابل، مع تقليل نسبة حدوث الـ *Fusarium* ومستوى السموم الفطرية سواء في التجارب المخبرية، تجارب الدفيئة أو التجارب الميدانية (Shi et al., 2014 ; Zhao et al., 2014). مثلا، توصلت Mnasri وآخرون (2016) الى عزل عدة أنواع، من كلا المنطقتين المذكورتين أنفا لنبات القمح و الشعير، تنتمي الى أجناس مختلفة هي *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Microbacterium* مع هيمنة واضحة لجنس *Bacillus* والذي أظهرت السلالات التابعة له قدرة كبيرة على مكافحة الـ *F.culmorum* عن طريق تثبيط نمو الميسيليوم الذي فاق 75% أو من خلال تحسين النمو النباتي عن طريق تحسين معدل الإنبات و كذلك تحسين طول الجذور والسيقان ووزنيهما بنسبة تعدت 50%.

يمكن أن تؤثر البكتيريا والفطريات المضادة على مسببات الأمراض من جنس *Fusarium* عبر أنماط مختلفة من التأثير: التأثير المباشر (الطفيليات الفطرية)، المسار المختلط (Mixed-path) (إفراز المضادات الحيوية، إنتاج الإنزيمات الخلوية) والتأثير غير المباشرة (تحريض استجابات دفاع المضيف). يمكنها أيضا تحويل السموم الفطرية الى مواد أخرى وبالتالي خفض الأخطار الكامنة للـ *Fusarium* (Wachowska et al., 2017).

1.4.6- محاسن المبيدات الحويية (Advantages of Biopesticides)

تزايد استخدام الكائنات الحية الدقيقة ضد مسببات الأمراض النباتية في السنوات الأخيرة بسبب زيادة طلب المستهلكين على استخدام منتجات قليلة المعالجة بالمواد الكيميائية لصالح صحة الإنسان والبيئة (Baffoni et al., 2015).

يمكن تعريف المبيدات الحويية أو عوامل مكافحة البيولوجية هذه على أنها منتجات صحية نباتية يكون الجزء النشط فيها هو كائن حي أو أحد مشتقاته (Thakore, 2006). تتميز المبيدات الحويية بتوافقها

الكبير مع البيئة مقارنة مع المواد الكيميائية كما تتمتع بالتخصص الكبير ضد الممرض الموجهة اليه، فهي بذلك أقل ضرراً للكائنات غير المقصودة بالمعالجة والتي قد تكون ذات فائدة للنبات. بالإضافة إلى ذلك، غالباً ما تكون المبيدات الحيوية فعالة بكميات صغيرة ويمكن أن تنشأ أنشطتها الوقائية من آليات متعددة وبالتالي نادراً ما تؤدي إلى ظهور ظاهرة المقاومة عند المسببات المرضية (Thakore 2006 ; Fravel 2005). يمكن أن تكون المبيدات الحيوية مكملة للمعالجة الكيميائية، ويمكن استخدامها أيضاً في المواقف التي لا يتوفر فيها أي حل للتحكم باستعمال المنتجات الاصطناعية (Bubici et al., 2019).

2.4.6- مساوئ المبيدات الحيوية (Disadvantage of biopesticides)

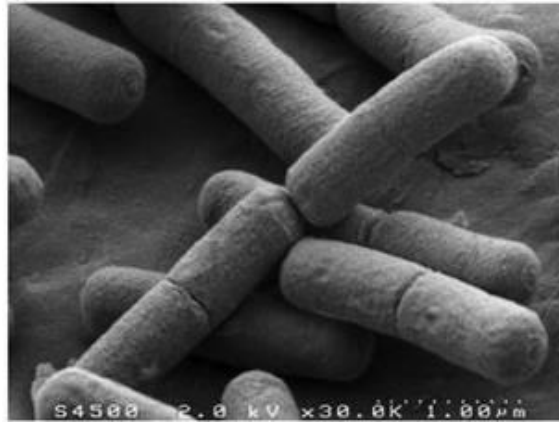
على الرغم من كل المحاسن التي تمتلكها، يبقى سوق المبيدات الحيوية دائماً مقيد بعدة معوقات أولها: التأثير الوقائي يكون في بعض الحالات غير كافي أو، في حالات أخرى، غير مستقر بالمقارنة مع المواد الكيميائية حيث تتأثر الفعالية خاصة بظروف الوسط (الحرارة، التربة، الرطوبة والأس الهيدروجيني ...) (Larkin and Fravel, 2002). ثانيها: التكلفة الكبيرة والتي تتعلق بالتكاليف الكبيرة لإنتاج عوامل مكافحة الحيوية. ثالثها: يعد التغليف والتشكيل (packaging and formulation) صعباً للغاية بالنسبة لأنواع غير المتبوعة وأحياناً حتى بالنسبة لأنواع المتبوعة (Collins and Jacobsen, 2003). بالمقابل، توفر المبيدات الكيميائية نشاطية كبيرة وسريعة نسبياً على عكس المبيدات الحيوية التي تتطلب غالباً بعد تطبيقها مدة من أجل بدء تأثيرها. لا ننسى أيضاً أن المبيدات الحيوية تتكون أساساً من كائنات حية والتي تمتلك عموماً مجال فعالية ضيق نسبياً (عدد محدود من الكائنات المستهدفة).

5.6- البكتيريا الجذرية ذات الخاصية الضدية (Antagonistic rhizobacteria)

1.5.6- الجنس *Bacillus*

1.1.5.6- الخصائص العامة

يضم الجنس *Bacillus* مجموعة متنوعة جداً من الكائنات الدقيقة، تتميز عناصر هذه المجموعة بشكلها العصوي (مستطيلة) ذات نهايات مربعة أو مدورة، ذات أحجام مختلفة (0.5×1.2 μm إلى 2.5×10 μm) (شكل 13)، موجبة الغرام أو مختلفة الغرام (يتغير الغرام مع التقدم في السن)، متحركة عموماً عن طريق أسواط موزعة على كامل سطح الخلية (*Peritrichous ciliature*) (ما عدا النوعان *Bacillus anthracis* و *B. mycoides*)، نادراً ما تمتلك الكبسولة (ما عدا *B. anthracis*)، قد تكون هوائية إجبارية (تنفس) أو لا هوائية اختيارية (تخمير)، قادرة على التبروغ في الظروف غير الملائمة، تستطيع الأبواغ مقاومة العوامل الفيزيوكيميائية (40 د في 120م°) (Prescott et al., 2002 ; Talaro and Talaro, 2002). مظهر المستعمرات على الوسط الصلب جد متنوع كما أن ظاهرة التفكك جد شائعة.



شكل 13. صورة بالمجهر الإلكتروني لخلايا *Bacillus subtilis* (Bhavya and Umesh, 2017).

من ناحية التغذية فهي Chemoheterotrophs مع أن بعض الأفراد لها متطلبات خاصة، أغلبية السلالات محبة للحرارة المعتدلة (بين 35 و 40 م°)، بعض السلالات محبة للحرارة العالية (Thermophilic) فهي تنمو جيدا بين 65 و 75 م° (Talaro and Talaro, 2002; Baron et al., 1996)، البعض الآخر محب للبرودة (Psychrotrophic) أو محب للحموضة أو الملوحة أو حتى القاعدية. أغلبية الأنواع تم عزلها من التربة، الماء أو الأغذية الملوثة. في الظروف المخبرية القياسية فان زمن الجيل يقارب 25 د، أغلبية الأنواع تنمو على أوساط الزرع البسيطة مثل الجيلوز المغذي (Todar, 2008).

تستطيع بعض الأنواع تثبيت الأزوت فهي بذلك تؤثر على بعض النباتات (الخضار خاصة) لتشكيل العقد الجذرية والتي تستطيع من خلالها التعايش مع النبات (Hiremath, 2012).

يمكن لبعض الأنواع إنتاج أنزيمات خارج خلوية محللة (Hydrolytic extracellular enzymes) التي تفكك البروتينات، الأحماض النووية، السكريات المعقدة والدهون. تستعمل بعض الأنزيمات المنتجة من طرف هذه البكتيريا في المنظفات المبيضة كما تستعمل الأنزيمات المحللة للسكريات في هدم النشا (Bouassida et al., 2018; Kalpana et al., 2016).

يعتبر بعض أنواع هذه المجموعة ممرضا للحشرات، النوع *Bacillus thuringiensis* يتم استعماله على نطاق واسع كمبيد حشري حيوي (Prescott et al., 2002).

2.1.5.6- التصنيف المظهري

تم في الإصدار الثاني لدليل Bergey (2004) الفصل بين أهم الأنواع المتبوعة الى صنفين مختلفين داخل شعبة الـ *Firmicute* وهما *Clostridia* و *Bacilli*. يضم صف الـ *Clostridia* رتبة *Clostridiales* وعائلة *Clostridiaceae* التي تضم 11 جنس من ضمنها الـ *Clostridium*. أما صف الـ *Bacilli* فيضم رتبة *Bacillales* وعائلة *Bacillaceae*، تضم هذه العائلة 37 جنس إضافة الى جنس الـ *Bacillus*.

3.1.5.6- التصنيف الحديث

يعتبر تسلسل الحمض النووي الريبوزومي (16S rRNA) عاملاً قوياً في التصنيف، الذي يمكن أن يكون لدية أيضاً علاقة مع التصنيف المظهري. يمكن تقسيم الجنس *Bacillus* على أساس تسلسل الـ 16S للـ DNA/RNA الى فوجين هما فوج *B. subtilis* وفوج *B. cereus*. تكون خلايا الفوج الأول أقل من 1 μ m واحد في العرض، الأبواغ الداخلية غير منتفخة وإهليلجية الشكل، عموماً محبة للحرارة والأس الهيدروجيني المعتدلين بينما تكون في الغالب متحملة للأوساط القاعدية. من بين أنواع هذا الفوج نجد *B. licheniformis*، *B. pumilus*، *B. subtilis* و *B. lentus* وغيرها (Fritz, 2004).

يضم الفوج الثاني، فوج الـ *B. cereus*، الأنواع سهلة التمييز مقارنة مع أنواع الفوج الأول، لكنها في الحقيقة صعبة التمييز فيما بينها. تكون خلايا أنواع هذا الفوج كبيرة نسبياً (أكبر من 1 μ m)، الأبواغ الداخلية غير منتفخة وذات شكل إهليلجي أيضاً. محبة عموماً للحرارة و pH المعتدلين. الملامح الكلاسيكية لتمييز هذه المجموعة هي: عدم قدرتها على إنتاج الحمض انطلاقاً من المانيتول ومدى تصنيعها لأنزيم الليسيثيناز. من بين أنواع هذا الفوج نجد *B. cereus*، *B. anthracis*، *B. mycoides* و *B. thuriangensis* (Fritz, 2004).

4.1.5.6- جنس الـ Bacillus كعوامل مكافحة حيوية

تمثل المبيدات الحيوية المعتمدة على البكتيريا الشطر الأكبر من بين باقي المبيدات الحيوية الميكروبية الأخرى (Shoresh et al., 2010)، كما ان الجنس *Bacillus* هو أكثر البكتيريا دراسة وهو الأكثر استعمالاً في المجال الزراعي. يستطيع جميع أنواع الـ *Bacillus* التحول الى الشكل البوغي في الظروف غير الملائمة الأمر الذي يسهل عملية انتاجها الصناعي ومن ثم تحويلها الى منتج ثابت (Lolloo et al., 2010). يلخص الجدول 3 أهم سلالات *Bacillus* التي يتم تسويقها في جميع أنحاء العالم باعتبارها مخصبات حيوية وعوامل مراقبة حيوية (Schisler et al., 2004).

تؤثر أنواع الـ *Bacillus* على الأحياء الدقيقة الممرضة عن طريق إنتاج الأنزيمات والمضادات الحيوية، خاصة عندما تكون الخلايا في مرحلة الثبات ضمن دورة النمو. ربما يكون هذا التصرف عبارة عن استراتيجية للحد من التنافس البكتيري حول مصدر الطاقة التي تنتج عن هدم الجزيئات العملاقة (Okulate, 2009). يصل عدد المضادات الحيوية التي ينتجها جنس الـ *Bacillus* 167، حيث 66 منها عبارة عن مضادات حيوية مكونة من ببتيدات تصنعها البكتيريا *B. subtilis*. يتخصص كل من المضادات الحيوية Bacitracine، مركب Tyrothricine و Gramicidine S ضد البكتيريا موجبة الغرام، بينما تتخصص مركبات أخرى مثل Polymyxine، Colistine و Circuline بشكل شبه حصري ضد البكتيريا سالبة الغرام، أما بالنسبة للـ Bacillomycine، Mycobacilline و Fungistatine فهي عوامل فعالة ضد الأعفان و الخمائر (Fernandes et al., 2007). ينتج النوع *Bacillus subtilis* أيضا أنواع أخرى من المضادات الحيوية مثل 32 Subtiline (عبارة عن ببتيد)، Bacilysine (ثنائي ببتيد)، Subsporins A-C (متعدد ببتيد دهني)، Rhizocitine A-D (متعدد ببتيد فوسفوري) و Iturine (ببتيد دهني) (Okulate, 2009).

جدول 3. منتجات المكافحة الحيوية التجارية المعتمدة على أنواع الـ *Bacillus* (Schisler et al., 2004).

النوع البكتيري	المنتج التجاري	الهدف الأولي
<i>B. subtilis</i> QST713	Serenade	الفطريات والبكتيريا على الخضار والفواكه
<i>B. licheniformis</i>	Ecoguard	الفطريات على العشب الاصطناعي
<i>B. subtilis</i> GB03	Kodiak	الفطريات على الفاصولياء، القطن والصويا
<i>B. pumilis</i> GB34	Yield shield	الفطريات على الصويا
<i>B. amyloliquefasciens</i>	Bioyield	الفطريات على النباتات الحولية
<i>B. subtilis</i> MB1600	Subtilex	الفطريات على القطن والصويا
<i>B. subtilis</i> MB 1600	Hi stick	الفطريات على الصويا

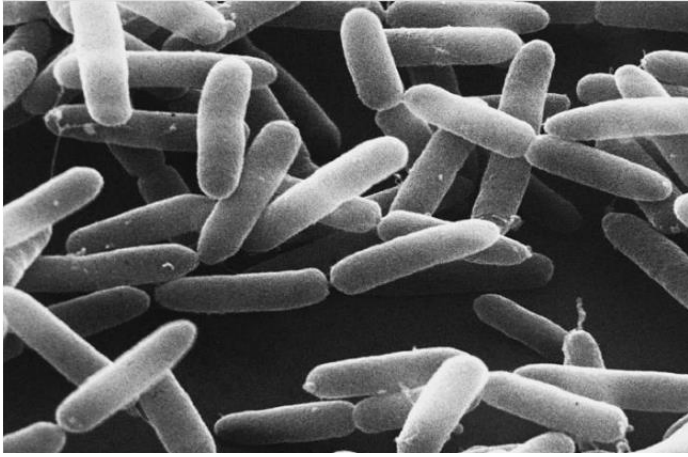
من جهة أخرى، المضاد الحيوي Surfactin، وهو عبارة عن ببتيد دهني يتميز بالفعالية العالية ضد عدة ميكروبات، تصنعه عدة أنواع من الـ *Bacillus* إلا أن النوع *Bacillus subtilis* هو الأكثر إنتاجا (Desmyttere, 2019). توجد مضادات أخرى متغيرة (مشتقة) عن الـ Surfactin مثل Lichenysin و Pumilacidin تم عزلها من استعمال *B. licheniformis* و *B. pumilus* على التوالي (Domingos et al., 2015). كذلك، تفرز *B. laterosporus* ببتيدات صغيرة ذات مجال واسع في الضدية الحيوية مثل Loloatine A. يجمع النوع *Bacillus cereus* نوعين من المضادات الحيوية في الجزء الطافي من المزارع الخاصة بها وهما Zwittermicine A و Kanosamine (Sadfi et al., 2002).

اهتمت الكثير من الدراسات بالبحث حول كفاءة أفراد هذا الجنس في مكافحة الفطريات الممرضة للنبات، توصلت الكثير منها الى عزل واستعمال العديد من الأنواع التي تمتلك فعالية عالية في الحد من (أو حتى القضاء) الأضرار التي تسببها الفطريات حيث استطاع، مثلاً، Agarwal وآخرون (2017) تثبيط نمو كل من فطر *Rhizoctonia solani* وفطر *F. oxysporum* اللذان يسببان مرض تعفن الجذور والبذور وكذلك الثمار لنبات الحنطة السوداء باستعمال النوع البكتيري *Bacillus pumilus MSUA3* حيث توصلوا الى نسب تثبيط بين 72.8% و 78.9%. باستعمال النوع *B. subtilis* SG6 تمكن Zhao وآخرون (2014) من تثبيط كل من نمو الميسيليوم، انتاج الأبواغ وكذلك انتاج السم الفطري DON، لفطر *Fusarium graminearum* المعروف بكونه المسبب الرئيسي لمرض لفحة السنابل (FHB) عند نبات القمح، بنسب وصلت 87.9%، 95.6% و 100% على الترتيب، كما أظهرت السلالة *B. amyloliquefaciens* FZB42 نشاطية واضحة ضد نفس الفطر من خلال احداث تشوهات هيكلية على مستوى الخيوط الفطرية، وكذلك باستعمال المضاد الحيوي Fengycin (الذي تنتجه هذه السلالة) تم كبح نمو الفطر وبذلك تمت مكافحة حدوث المرض كما تم خفض انتاج السموم الفطرية DON و ZEN (Hanif et al, 2019). العديد من العزلات التابعة للنوع *B. amyloliquefaciens* تم تطويرها تجارياً كعوامل مكافحة وكأسمدة حيوية (Borriss et al., 2011). باستعمال العزلة *B. velezensis* CC09 استطاع Cai وآخرون (2017) تثبيط نمو كل من *Alternaria alternata*، *Phytophthora capsici*، *Aspergillus niger*، *Geotrichum candidum* و *Mycosphaerella pomi* بنسب وصلت 91.7%، 23.5%، 34.6%، و 58.3% و 47.4% على التوالي.

تخلق النباتات بيئة غذائية وفيزيو-كيميائية خاصة من أجل نمو الكائنات الدقيقة على مستوى المحيط الجذري (Bais et al., 2006). تعمير الجذور من طرف *Bacillus* عبارة عن آلية معقدة يمكن أن تتدخل فيها الببتيدات الدهنية (lipopeptides) على عدة مستويات. تتمثل ظهرة التعمير خاصة في تشكل الغشاء الحيوي (Biofilm) عن طريق التصاق وتجمع المستعمرات الميكروبية (Ramey et al., 2004). وضح Bais وآخرون (2004) دور الـ surfactine في تشكيل غشاء حيوي مستقر من طرف السلالة *B. subtilis* 6051 على جذور نبات *Arabidopsis*، كما توصلوا الى أن هذا الغشاء يجعل النبات أقل حساسية للإصابات الجرثومية. إن إيقاف التعبير عن مورثة surfactine لهذه السلالة أدى الى انخفاض التعمير وكذلك المقاومة الحيوية للمرض المسبب من طرف *Pseudomonas syringae* (Ahimou et al., 2000). يمكن أن يؤدي تخليق حمض الساليسيليك بواسطة البكتيريا إلى جعل النباتات أكثر تحملاً للطفيليات ومسببات الأمراض من خلال تنشيط المقاومة الجهازية المستحثة (induced systemic resistance ISR) (Kloepper et al., 2004).

2.5.6-الجنس Pseudomonas**1.2.5.6-الخصائص العامة**

حسب Palleroni (2009)، هي عبارة عن عصيات سالبة الغرام، لا يمكنها تصنيع الأبواغ الداخلية، مستقيمة ورفيعة، ذات نهايات مستديرة، مع وجود سوط واحد أو عدة أسواط قطبية (شكل 14)، ذات محتوى من CG بين 58 و69%، ذات حجم متوسط 2 على 0.5 μm .
 الأنواع المفلورة (*pseudomonades fluorescents*) لها القدرة على إنتاج مادة pyoverdine المفلورة (تعطي اضاءة مفلورة تحت الأشعة فوق البنفسجية)، هذه الأنواع هي خصوصا *Pseudomonas aeruginosa*، *P. syringae*، *P. putida* و *P. fluorescens* (Palleroni, 2009).



شكل 14. بكتيريا *Pseudomonas Aeruginosa* تحت المجهر الإلكتروني الماسح (David, 2014).

2.2.5.6- الخصائص الاستقلابية

يتميز هذا الجنس باستقلاب تأكسدي (هوائي اجباريا) وغير تخمري، تستعمل الأكسجين كمستقبل نهائي للإلكترونات، كما أن بعض الأنواع تستعمل آلية نزع النيتروجين (Denitrification) حيث يستعمل النيترات في بعض الأحيان كمستقبل للإلكترونات وهذا ما يسمح بحدوث نمو لاهوائي (Lelliot *et al.*, 1996).

تعتبر الأنواع المفلورة لكـ *Pseudomonas* رمية المعيشة (Saprobiontic)، إلا أن بعض الأنواع ممرضة للنبات (*P. syringea*) و بعضها الآخر ممرض وحتى قاتل للإنسان (*P. aeruginosa*) (Mavrodi *et al.*, 2001)، موجبة الكتلاز، محبة للحرارة المعتدلة، من ناحية التغذية فهي "chemoorganotrophic" فهي إذن تستطيع استعمال مصادر متنوعة للكربون، إضافة الى أنها تستطيع العيش على وسط معدني يحتوي على مصدر وحيد للكربون، تستطيع بعض الأنواع استعمال الهيدروجين كمصدر وحيد للطاقة ولا تحتاج الى عوامل النمو من أجل التكاثر، بينما تستطيع أنواع أخرى النمو حتى

في الماء، تحدد هذه الخصائص الأهمية الكبرى لهذه الكائنات كعناصر مشاركة في دورة الكربون في الطبيعة (Palleroni *et al.*, 1970 ; Stanier *et al.*, 1996).

تستطيع هذه البكتيريا هدم المركبات المعقدة مثل البروتينات والسكريات المتعددة كالنشأ، السيليلوز (Palleroni, 1984). تمت الإشارة إلى العديد من عزلات *P.putida* و *P.fluorescens* على أنها سلالات قادرة على هدم جزيئات عطرية معقدة نسبياً. من ناحية أخرى، يبدو أن استعمال (امتصاص) المركبات العطرية أقل شيوعاً في العزلات الآتية من التربة غير الملوثة أو من المحيط الجذري (Latour *et al.*, 1996). في الأخير، تستطيع بعض العشائر التابعة لهذا الجنس افراز (اطراح) غاز الأزوت (-Clays (Josserand *et al.*, 1995). تشارك هذه البكتيريا بشكل معتبر في ارجاع النيترات والنترت اللذان يعتبران من الملوثات للمياه الجوفية (Latour and Lemanceau, 1997).

بسبب تنوع المسارات الاستقلابية المستعملة من طرفها نجدها غالباً قادرة على مقاومة عدة مطهرات ومضادات حيوية، هذا ما يفسر تواجدها الواسع في الأوساط الاستشفائية أين يمكن عزلها من البيئات الرطبة (Euzeby, 2008).

يصنع أفراد هذا الجنس طبقة خارجية متعددة السكر (Exopoly-saccharide) تحيط بالخلية، تقوم هذه الأخيرة بالوقاية ضد عملية البلعمة داخل خلايا الثدييات. تسمح هذه الطبقة أيضاً بتشكيل الأغشية الحيوية (bio-films) الضرورية لعملية الالتصاق على الأسطح المختلفة (Visca *et al.*, 2007).

من جهة أخرى، يصنع هذا الجنس عدة مستقلبات مثل Polyhydroxyalkanoates و Alginates وهي مواد ذات أهمية في المجال البيوتكنولوجي (Poblete-Castro *et al.*, 2012).

3.2.5.6- التصنيف والأصل الوراثي

في الإصدار الثاني لكتاب "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (2005)، تم تصنيف *Pseudomonas* كالتالي:

ميدان: Bacteria

شعبة: Proteobacteria

صف: Gamma-Proteobacteria

رتبة: Pseudomonadales

عائلة: Pseudomonadaceae

جنس: *Pseudomonas*

في السبعينيات من القرن العشرين، تم وبنجاح تصنيف جنس *Pseudomonas* (عن طريق الخصائص الوراثية) من طرف Palleroni وآخرون الذين أظهروا أن هذا الجنس غير متجانس وراثيا وعليه يمكن تقسيمه الى 5 أقسام فرعية ذات rRNA مختلف.

أدت دراسة تركيب الجينوم من حيث القواعد من جهة والبحث عن تماثلات التسلسل الجيني عن طريق التهجين (ADN/ARN أو ADN/ADN) إضافة الى مقارنة التسلسلات الخاصة بالمورثة المشفرة للـ rARN 16S من جهة أخرى الى تطور التصنيف ضمن جنس *Pseudomonas* والأجناس ذات الصلة (Anzai et al., 2000).

يضم الجنس *Pseudomonas sensu stricto* الموافق للفوج "RNA I" أكثر من 100 نوع مختلف. بينما تم إعادة تصنيف الأنواع الأخرى من *Pseudomonas sensu lato* (الأفواج RNA II الى RNA V) ضمن أجناس أخرى، سمح هذا الإجراء بالتفريق بين جنس *Pseudomonas* و الأجناس القريبة التي تضم: *Burkholderia*، *Brevundimonas*، *Agrobacterium*، *Acetobacter*، *Acinetobacter*، *Achromobacter*، *Ralstonia*، *Shewanella*، *Flavobacterium*، *Flavimonas*، *Comamonas*، *Chryseomonas* و *Sphingobacterium* و *Stenotrophomonas* (Deschaght et al., 2011 ; Ginard et al, 1997).

يقسم الجنس *Pseudomonas sensu stricto* عادة الى فوجين هما: *Pseudomonas spp.* المفلورة (مثل *P. aeruginosa*، *P. fluorescens*، *P. putida* و *P. syringae*) و *Pseudomonas spp.* غير المفلورة (مثل *P. alcaligenes*، *P. fragi* و *P. sutzeri*). يوافق هذا التفريق، الذي لا يملك قيمة تصنيفية رسمية، قدرة أو عدم قدرة البكتيريا على إنتاج نوع خاص من حاملات الحديد (Siderophore) وهو pyoverdine (Ginard et al, 1997).

الـ Pyoverdine عبارة عن صبغة قابلة للانحلال تصبح مفلورة تحت الأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي القصير (254 نانومتر) تدعى في مجموعها الصبغات الفلورية (Fluorescent Stains)، تعطي بعض الصبغات الأخرى القابلة للانحلال للـ phénazine فلورة تحت الأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي 350 نانومتر (Rossinol, 2007).

لأنها عبارة عن حاملات قوية للحديد، تلعب صبغة Pyoverdine دورا فيزيولوجيا مهما. يتعلق إنتاج Pyoverdine بكمية شوارد الحديد (Fe^{+3}) الموجودة في وسط الزرع من جهة (يزيد الإنتاج كلما قل الحديد الحر في الوسط) وباحتياجات البكتيريا من جهة أخرى (Rehm-Bernd, 2008).

يعد النوع *P. fluorescens* من بين الأنواع التي تظهر تنوعا مظهريا ووراثيا كبيرا. جمع Bossis وآخرون سنة 2000 معلومات تتعلق بمختلف الدراسات التصنيفية حول هذا النوع، فتوصلوا الى أن هذا النوع يضم 7 أنواع حيوية (Biovar) حيث يعتمد الانتماء من عدمه على نوع العناصر الكربونية المستعملة. بالاعتماد على المفاتيح المتعلقة بالانقسام ثنائي التفرع (Dichotomous) (Bossis et al.,)

(2000) من جهة، وعلى التنميط من حيث حاملات الحديد (siderotyping) من جهة أخرى، يمكن وبدقة تحديد انتماء سلالة بكتيرية الى نوع حيوي معين (Meyer et al., 1998).

4.2.5.6- التوزع البيئي

نظرا لمتطلباتها الغذائية القليلة وتنوعها الاستقلابي الكبير يستطيع أفراد هذا الجنس التواجد في بيئات جد متنوعة في حدود الأس الهيدروجيني والحرارة المعتدلتين (لا تتحمل الوسط الحامضي ولا القاعدي ولا الحرارة المرتفعة) (Palleroni, 1992). يمكن لهذه البكتيريا العيش في الماء النقي وحتى المعدني (Rosenberg, 1990)، في المياه الساحلية و عدة بيئات البحرية (Romanenko et al., 2008 ; De ley, 1992)، وحتى بيئات صحراوية مثل *P. duriflava* (Liu et al, 2008)، بعضها الآخر تعيش مرتبطة بالجذور وتم عزلها من عدة نباتات مختلفة (Achouak et al., 2004)، بعضها تم عزله من منطقة phyllosphère في النباتات مثل *P. lurida* (Behrendt et al., 2007). يرجع هذا التوزع الى التأقلم الفيزيولوجي والوراثي الكبير (Spires et al., 2000).

5.2.5.6- الأهمية البيئية والاقتصادية

يستطيع أفراد هذا الجنس تفكيك وتبسيط عدة مركبات عضوية، نجد من بينها المركبات الهالوجينية، الهيدروكربونات العطرية والمبيدات الحشرية (Ramos, 2004). يمكن أن تستعمل أيضا في عمليات المعالجة الحيوية (Bioremediation) (Stallwood et al., 2005).

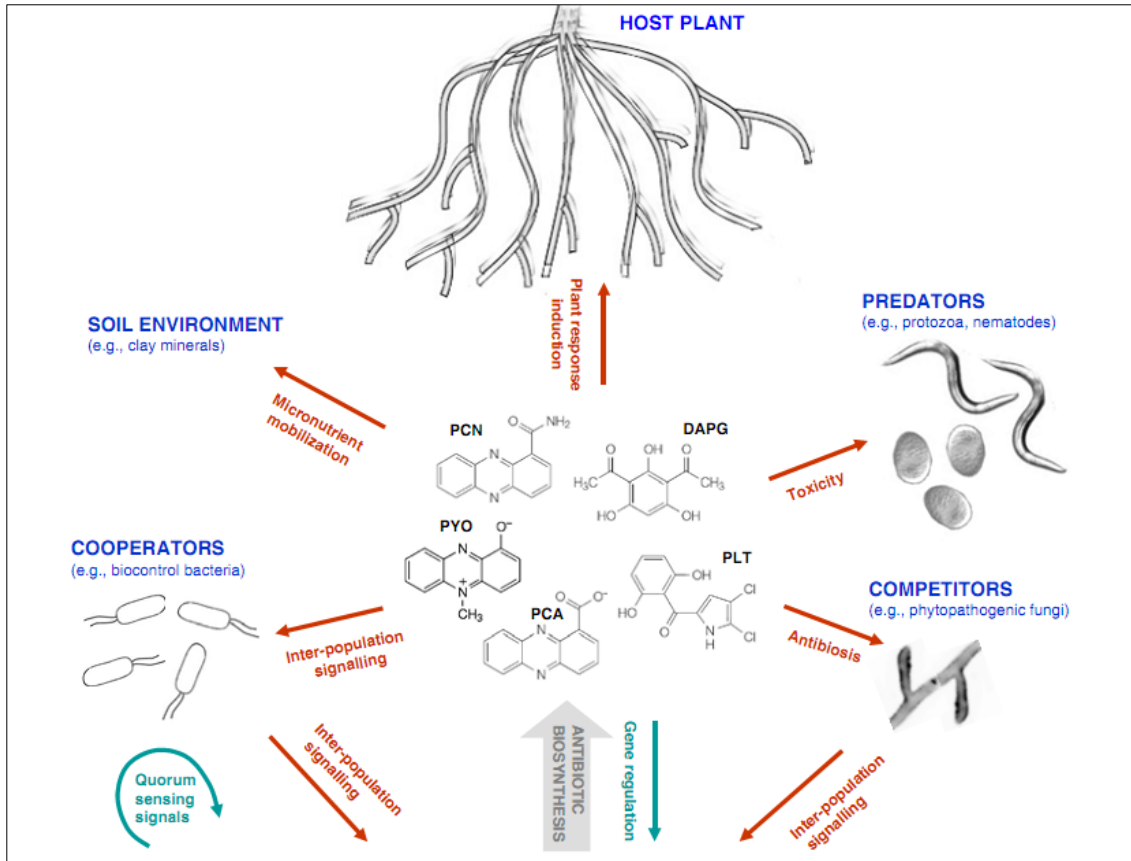
لأفراد هذا الجنس أهمية في الجانب الصناعي، الأفراد المحبة للبرودة (Psychrotrophic) مثلا تصنع أنزيمات مقاومة للحرارة مثل الليباز والبروتياز (Gounot, 1991)، بإمكان هذه الأخيرة تحمل عملية البسترة وحتى المعاملة بالحرارة الجد عالية (UHT). يوجد نوع آخر من الأنزيمات ذات الأهمية تنتج هذه البكتيريا وهو الأميلاز الذي يستعمل في إنتاج *malto_oligosaccharides* عن طريق الهضم الإنزيمي للنشا (Derde et al., 2012). من خلال النشاطية الاستقلابية المعروفة لأفراد *Pseudomonas* تجاه الهيدروكربونات العطرية تم اقتراح استعمالها في عملية إزالة السمية عن طريقة تفاعلات إزالة الهيدروكسيل (Deshydroxylation) (Davies et al., 1990).

التطبيق المحتمل للـ *Pseudomonas* في المعالجة الحيوية راجع الى قدرتها المعروفة على هدم المركبات الغريبة الحيوية (Xenobiotic)، ولا سيما المنتجات العضوية الهالوجينية، المبيدات العشبية، المذيبات ومزيلات الدهان (Poblete-Castro et al., 2012). توصف هذه البكتيريا على أنها واقية للنبات (Phytoprotective) تلعب دورا رئيسيا في مكافحة الحيوية في منطقة المحيط الجذري (Walsh, 2001).

من جهة أخرى، توجد أنواع أخرى ممرضة للنبات، مثل *P.syringae* التي تضم حوالي 50 نوع ممرض (Pathovars) (Arnold and Preston, 2019). بسبب تنوع الطرق الاستقلابية تستطيع هذه البكتيريا غالباً مقاومة عدة مطهرات ومضادات حيوية (Feuilloley, 2007). على مستوى المحيط الجذري (rhizosphere)، يمتلك أفراد جنس *Pseudomonas* تأثيراً إيجابياً عن طريق توفير بعض المغذيات الضرورية لنمو النبات. كما يمكنها حمايته من الكائنات الدقيقة الممرضة عن طريق تحفيز آليات المقاومة الداخلية للنبات من خلال إفراز مركبات مضادة للبكتيريا والفطريات و/أو عن طريق التنافس على المغذيات (Lemanceau et al., 2009).

6.2.5.6- جنس الـ *Pseudomonas* كعوامل مكافحة حيوية

يمثل فوج *Pseudomonas* المفلورة الفوج الأكثر أهمية من بين البكتيريا الجذرية المحفزة للنمو النباتي، بفضل خصائص عدة من بينها التعمير القوي للجذور، العقد الجذرية وغيرها، كذلك القدرة على استعمال عدد كبير من مواد التفاعل (الركائز) العضوية. من جهة أخرى، فهي سهلة التسمية في المختبر وهي قادرة على إنتاج عدة مستقبلات ثانوية تعمل على تسميم البكتيريا والفطريات الممرضة. توصل Islam وآخرون (2018) إلى تنشيط فطر *Fusarium oxysporum* باستعمال العزلة *Pseudomonas aeruginosa* RKA5، بنسبة وصلت 90.02% من كتلة الفطر وبنسبة وصلت 56.66% من النمو الشعاعي باستعمال رشاحة المزرعة الخالية من الخلايا (Cell-free culture filtrate). صرح Suryakala وآخرون (2004) أن *Pseudomonas fluorescens* كانت مضادة لكل من *Fusarium oxysporum* Sp، *Alternaria* و *Colletotrichum capsicii*. وجد Mishra وآخرون (2005) باستعمال سلالتين من *Pseudomonas* المفلورة وهما RRLJ134 و RRLJ04 اللتان تم عزلهما من المحيط الجذري للشاي والرز على الترتيب أنهما تمتلكان ضدية معتبرة ضد *Fomes lamoensis* و *Ustilina zonata* المسببان للتعفن البني للرز وتفحم خشب جذور الشاي على الترتيب. أدى استعمال هاتين السلالتين إلى إزالة المرض بشكل معتبر على مستوى المشاتل. تصنع الأنواع المفلورة للـ *Pseudomonas* مجموعة مهمة من المستقبلات الثانوية، بالإضافة للأنزيمات المفككة للجدار الخلوي. الأكثر وصفاً من بين هذه المستقبلات نجد: phénazines، pyrrolnitrine و pyolutéorine. تؤثر هذه المستقبلات على مجال واسع من البكتيريا والفطريات (شكل 15). بعض هذه المستقبلات مثل tropolone تمتلك مجالاً نشاطية واسعاً ضد عدة ميكروبات ممرضة (بكتيرية وفطرية)، قد يكون هذا الأمر غير مرغوب فيه بسبب أنه يؤثر على عدة أحياء دقيقة مفيدة (Lindberg, 1981).



شكل 15. أهم المضادات الحيوية المصنعة من طرف سلالات المراقبة الحيوية (*Pseudomonas*)

PCN : phénazine-1- carboxamide ، PYO : pyocyanine ، PCA : phénazine-1-carboxylate .(Dubuis *et al.*, 2007)
 DAPG : 2,4, diacétyl phloroglucinol ، PLT : pyolutéorine.

تمكن Rane و آخرون (2007) باستعمال phenazine-1-carboxylate النقي المصنع من طرف البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* ID 4365 من تثبيط كل من *Aspergillus niger* NCIM 1025 ، *Colletotricum falcatum* ، *Sclerotium rolfisii* NCIM 1084 ، *Fusarium oxysporum* NCIM 1008 و عدة فطريات أخرى ممرضة للنبات.

الـ pyocyanin وهو مستقلب منتج من طرف النوع *Pseudomonas aeruginosa* يمكن استعماله في تثبيط فطر *Fusarium graminearum* المسؤول عن مرض لفحة السنابل (FHB) بنسبة تصل الى 50%، كما يثبط هذا المستقلب انتاج السموم الفطرية DON و NIV بنسبة 40% و 60% على الترتيب (Houshaymi *et al.*, 2019).

باستعمال العزلة *Pseudomonas protegens* MP12 تمكن Andreolli و آخرون (2019) من تثبيط كل من الفطريات *Botrytis cinerea* ، *Alternaria alternata* ، *Aspergillus niger* ، *Penicillium expansum* ، *Neofusicoccum parvum* إضافة الى كل من *Phaeoaniella chlamydospora*

و *Phaeoacremonium aleophilum* المسببان للمرض tracheomycosis المدمر لجذوع الكروم. توصل هؤلاء الباحثون من جهة أخرى أن هذه السلالة تمتلك المورثات المسؤولة عن بناء عدة مضادات حيوية معروفة بنشاطيتها ضد فطرية وهي 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG)، pyoluteorin و pyrrolnitrin وهذا ما يفسر آلية تأثيرها على هذه الفطريات.

يعتبر حمض سيانيد الهيدروجين (HCN) مثبتا قويا للـ cytochrome c oxydase للسلسلة التنفسية (Reddy, 2012). يتم انتاجه عند العديد من البكتيريا انطلاقا من الغليسين (كمادة أولية)، حيث تصنعه أكثر من 88% من أنواع *Pseudomonas* التابعة للمحيط الجذري (Ahmad et al., 2008). يستعمل هذا الغاز في مكافحة الحويبة لمرض التعفن الأسود لجذور التبغ (Voisard et al., 1989) وتعفن جذور الطماطم وكذلك ذبول شتلات الخيار (Ramette et al., 2003).

تم عزل 10 عزلات من النوع *Pseudomonas* المفلورة انطلاقا من محيط جذور كل من البطاطس، دوار الشمس والذرة التي أظهرت قدرة على تحسين النمو النباتي وإزالة نخر عنق الساق (neck necrosis) لنبات دوار الشمس عن طريق انتاج HCN (Shivani et al., 2005). توجد مركبات طيارة أخرى (غير HCN) مثل 2,3-butanediol و acétoine منتجة من طرف *Pseudomonas chlororaphis* O6 ومن طرف *Pseudomonas fluorescens* 89B61 على الترتيب، تؤدي إلى تحسن كبير في نمو النبات عن طريق تحفيز المقاومة للأمراض (Cho et al., 2013 ; Ryu et al., 2003).

المحور الأول

عزل وتشخيص الفطريات التابعة لجنس الـ *Fusarium* من بذور القمح

1- مقدمة

أثناء تشكل البذور، قد تتعرض الى الإصابة بفطريات مختلفة، تبقى هذه الأخيرة في البذور حتى بعد جنيها وتخزينها، فتصبح بذلك مصدرا للفطر الموجود بداخلها، يخرج هذا الأخير أثناء عملية الإنبات وبالضبط أثناء بروز السويقة والجذير.

تختلف هذه الفطريات اختلافا كبيرا، إلا أنها عموما تكون ذات أهمية اقتصادية (من حيث تأثيرها السلبي على المردود) وصحية بالغة (من اطراحها للسموم الفطرية التي تؤثر على صحة الإنسان والحيوان) لذلك وجب على الباحثين دراستها من أجل معرفة مدى قدرتها الإمراضية على النبات والإنسان، ومن ثمة البحث عن الطرق المناسبة لمكافحتها.

تركزت هذه الدراسة على جمع 59 عينة من بذور القمح الصلب بطريقة عشوائية، لغرض عزل الفطريات الداخلية فيها، تنقيتها في مزارع نقية ثم تعريفها وتحديد الأنواع أو الجنس على الأقل. وأخيرا دراسة القدرة الإمراضية لمعرفة مدى خطورة الأنواع المعزولة.

2- الوسائل والطرق

1.2- العينات النباتية

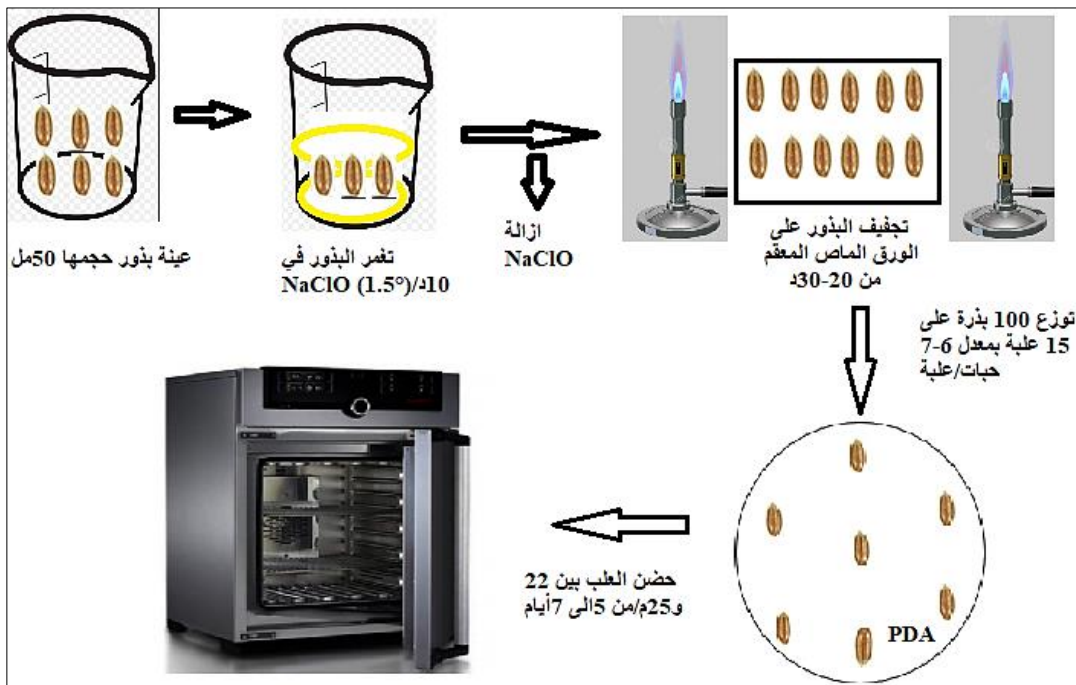
تم الحصول على 59 عينة بذور، من القمح الصلب، من المركز الوطني لمراقبة البذور والشتائل وتصديقها (National Center For Seeds And Plants Certification And Control) CNCC لولاية سطيف سنة 2016، مباشرة بعد موسم الحصاد، جمعت العينات من 7 ولايات من الشمال الشرقي للجزائر وهي: سطيف، برج بوعريبيج، مسيلة، باتنة، خنشلة، بسكرة وميلة. تنوعت العينات أيضا من حيث نوع القمح حيث كانت الأصناف المتوفرة هي: GTAdur، Ofanto، Vitron، واحة، بوسلام، مغرس ومحمد بن بشير (ملحق 4). تم وضع العينات في أكياس ورقية نظيفة ثم نقلت مباشرة الى مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية.

2.2- عزل الفطريات الداخلية

تمت عملية العزل باتباع المراحل المقترحة من طرف المخبر الوطني لحماية النبات بفرنسا (LNPNV) في تقرير سنة (2008)، حيث يجب أن تجرى عملية البحث عن الفطريات الداخلية على عينات ذات حجم أدنى مساو لـ 100مل. البذور المدروسة، التي تمثل العينة تجريبية، يجب ألا تقل عن 50مل كما يجب أن تؤخذ بطريقة عشوائية من العينة الإجمالية المأخوذة الى المخبر وذلك عن طريق الرج اليدوي القوي. يتم البحث عن الفطريات الداخلية وفق الخطوات التالية:

- التعقيم السطحي للبذور: تهدف هذه الخطوة الى إزالة جميع الملوثات السطحية سواء كانت من أصل حيوي أو لاصحي. يعقم ما مقداره 50مل من البذور بوضعها في بيشر، تغمر البذور لمدة 10د في محلول هيبوكلوريت الصوديوم ذو التركيز 1.5° الذي يضاف اليه Tween 20 بمعدل قطرتين في اللتر. يجب تحريك البذور جيدا من حين لآخر لتمكين جميع البذور من ملامسة محلول التعقيم. بعدها، ينزع محلول التعقيم عن طريق التقطير الجيد للبذور ومن ثم نشرها على ورق جفاف معقم وتغطيتها بأخر من أجل تجفيفها، تدوم عملية التجفيف من 20 الى 30د في المجال المعقم.
- حضن البذور: من بين البذور الجافة جيدا، يتم أخذ حوالي 100 بذرة عشوائيا، توضع مباشرة على وسط زرع (Potato Sucrose Agar) PSA بمعدل 6 الى 7 حبات في كل علبه بتري، تحضن العلب على حرارة 25±3م° حتى ظهور المستعمرات الفطرية (شكل 1.1).

- قراءة النتائج: بعد انتهاء مدة الحضان، تظهر مستعمرات الـ *Fusarium* عموماً بيضاء (أو باللون البني الفاتح) إلى وردية جد غامقة أو حتى بنفسجية، كما تتميز الأبواغ المنتجة من طرف الـ *Fusarium* بشكل مميز تحت المجهر.
- تنقية الفطريات: تؤخذ قطعة صغيرة من كل مستعمرة " *Fusarium* " محتملة، من حافة المستعمرة غالباً وبعيدة قدر الإمكان عن المستعمرات الأخرى، وتزرع على طبق بتري جديد يحوي الوسط PSA من أجل الحصول على مستعمرات نقية، التي تخضع مباشرة لعملية التعريف (LNPV, 2008).



شكل 1.1. مراحل عملية عزل الفطريات الداخلية من بذور القمح من أجل الحصول على عزلات الـ *Fusarium*.

3.2- التعريف المظهري للفطريات (دراسة ماكرو- وميكروسكوبية)

تحفظ العزلات الفطرية النقية على وسط الزرع PDA (Potato Dextrose Agar) في الظلام عند درجة الحرارة 4 م°. من أجل الدراسة الماكروسكوبية، تزرع العزلات على كل من الوسطين PDA و PSA (ملحق 1). الخصائص المدروسة هي معدلات النمو، مظهر ونوع نسيج المستعمرات، الصبغات المفترزة على كل من وجهي العلبة (Leslie and Summerell, 2006; Seddique *et al.*, 2010).

من أجل الدراسة الميكروسكوبية، يستعمل كل من وسط الزرع CLA (Carnation Leaf Agar) والوسط SNA (Seawater Nutrient Agar) من أجل التشخيص المظهري-المجهري. يتم تحضير وسط CLA وفق الطريقة المقترحة من طرف Seddique وآخرين (2010). انطلاقاً من المزارع النقية، تؤخذ قطعة صغيرة (5مم²) ثم توضع وسط الطبق المحتوي على CLA أو SNA (ملحق 1) ثم تحضن في 28م°. بعد 10 الى 15 يوم، تفحص قطعة من المستعمرة تحت المجهر الضوئي (Seddique et al., 2010).

تم إجراء التعريف المظهري باتباع الطريقة المقترحة من طرف Burgess وآخرون (1994) ومن طرف Leslie و Summerell (2006)، التي تعتمد على وجود/غياب الكونيديات الكبيرة، المتوسطة والصغيرة، شكلها وحجمها (إذا وجدت)، نوع الفياليدات (أحادية و/أو متعددة) وكذلك وجود أو غياب الأبواغ الكلاميدية، وجود سلاسل الكونيديات الصغيرة و Sporodochia.

4.2- التعريف الجزيئي

- من أجل تأكيد نتائج التعريف المظهري تم إجراء التعريف الجزيئي على مستوى مخبر " Gene life sciences" بولاية سيدي بلعباس بالشراكة مع مخبر " BIOfidal" بفرنسا وفق المراحل:
- استخلاص الـ DNA باستعمال طريقة (جهاز) الأمواج الدقيقة (microwave) المقترحة من طرف (Goodwin and Lee, 1993)
 - التضخيم بـ PCR باستعمال زوج البادئات ITS1 (3' GCG GCT GAA GGT GTA TCC 5') والزوج EF1-728F (3' GAA GCG GAA GGT CAT 5') ثم الهجرة الكهربائية.
 - تنقية نواتج الـ PCR الخاصة بـ ITS1 و EF1.
 - دراسة تسلسل الحمض النووي ثم التوافق (Alignment) باستعمال برامج خاصة بالتعديل والتحرير مثل برنامج " BioEdit" (<http://www.bioeditor.sdsc.edu/download.shtml>) من أجل الحصول على تسلسلات التوافق (consensus sequence). بعد ذلك، يتم اختيار التسلسلات الموافقة الأكثر صلة (قراءة) من بنك المورثات " GenBank" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). يتم بعدها إجراء توافق التسلسلات المتعدد (Multiple sequence alignments) بالصيغة " MEGA" باستعمال الخاصية " Clustal W" في برنامج " MEGA-X".

5.2- دراسة تأثير درجة الحرارة ونوع وسط الزرع على نمو الفطريات المعزولة

من أجل معرفة مدى تأثير تغيير كل من وسط الزرع ودرجة الحرارة على عزلات الـ *Fusarium* تم اجراء اختبارين مختلفين على أهم العزلات التي تم التعرف عليها في اختبارات العزل والتنقية (14 عزلة)، يتمثل هذان الاختباران في:

1.2.5- تأثير نوع وسط الزرع على النمو وعلى إنتاج الأبواغ

تهدف هذه الدراسة الى معرفة مدى تأثير النمو وكذلك عدد الأبواغ المنتجة بنوع وسط الزرع المستعمل، تم استعمال نوعين من أوساط الزرع وهما PSA وSNA. يتم قياس أقطار النمو وعدد الأبواغ في اليوم السابع. في كلا التجريبتين يؤخذ قرص من المستعمرة الفطرية، للعزلة المدروسة ذات 7 أيام، ذو قطر 6 مم ويوضع في منتصف العلبة الحاوية على وسط الزرع المناسب. ثلاث تكرارات تم القيام بها لكل وسط زرع مع كل نوع فطري.

يتم حساب عدد الأبواغ بإضافة 10مل من الماء المقطر المعقم الى المستعمرة ذات 7 أيام ثم تمزج الأبواغ مع الماء عن طريق كشط المستعمرة الفطرية، يجمع المزيج ويوضع في أنبوب اختبار، يرج هذا الأخير جيدا ثم تؤخذ منه 10 µl وتوضع على خلية "Malassez" من أجل حساب العدد، تكرر العملية 3 مرات ثم يحسب المعدل.

2.5.2- دراسة تأثير تغيير درجة الحرارة

تهدف هذه الدراسة الى معرفة درجة الحرارة المثلى التي تقابل أعلى معدل للنمو، باستعمال ثلاث درجات مختلفة وهي: 22، 25 و28 م° في الظلام وعلى وسط الزرع PSA. يتم قياس أقطار النمو في السابع من النمو.

6.2- حفظ العينات

بعد التأكد من نقاوتها، تزرع العزلات الفطرية في أنابيب تحوي الوسط المائل الصلب PSA وتحفظ في درجة حرارة 4م° لحين استخدامها.

7.2- اختبار القدرة الإمراضية

تم اختبار جميع العزلات الفطرية التي تم الحصول عليها من عملية العزل والتنقية. من أجل تقدير إمراضية العزلات الفطرية تجاه نبات القمح تم استعمال طريقتين مختلفتين للتلقيح ضد ثلاثة أصناف من بذور القمح وهي: بوسلام، واحة وGTAdur وهي الأنواع الأكثر زراعة في الشرق الجزائري. من أجل تقدير امراضية عزلات الـ *Fusarium* تمت الدراسة المخبرية " *in vitro* " عن طريق تلقيح البذور بالفطر المدروس ثم تقدير التأثير على ظهور ونمو غمد الريشة (coleoptile) بالمقارنة مع البذور غير الملقحة (شاهدة). تمت أيضا دراسة التأثير على الجزء القاعدي لشتلات نبات القمح عن طريق تلقيح التربة بالفطر المدروس. أخيرا، تم دراسة التأثير على السنابل بعد تلقيحها بالمعلقات الكونيدية (Abdallah et al., 2019).

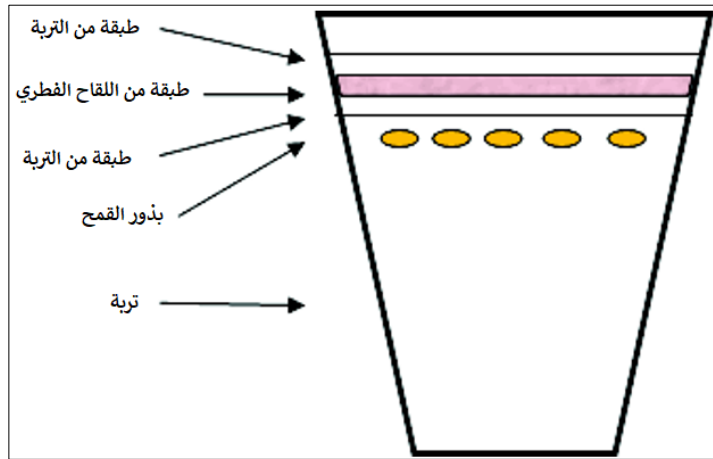
1.7.2- اختبار القدرة الإمراضية على ظهور ونمو غمد الريشة

- تم اعتماد الطريقة المطبقة من طرف Mesterhazy (1983)، تضم هذه الطريقة المراحل التالية:
- تلقح قارورات محتوية على 50مل من وسط (Potato Sucrose Broth) PSB بأربع أفراس ذات قطر 5مم مأخوذة من مزارع فطرية عمرها 7 أيام.
 - تخضع القارورات للرج باستعمال جهاز التحريك (GFL3005) بسرعة 175 دورة/د لمدة 7 أيام على درجة حرارة الغرفة.
 - يتم تحضير الميسيليوم المتجانس عن طريق جني الميسيليوم بواسطة الطرد المركزي (5000 دورة/د) (Sigma 3K30) ثم تخفيفه بإضافة الوسط PDB حتى الوصول الى التركيز 13مغ/مل ثم تتم مجانسته بإضافة 0.2% من " Tween 20 " .
 - توضع ورقة ترشيح " Whatman No.1 " معقمة داخل كل علبه بتري ثم يضاف عليها 8مل من الميسيليوم المتجانس.
 - توضع 25 حبة قمح معقمة سطحيا، من كل من الأصناف: بوسلام، واحة وGTAdur، في كل علبه بتري ثم تغطى بورقة ترشيح أخرى ثم تحضن العلب في درجة حرارة 25°م لمدة 4 أيام. تم استعمال أربع تكرارات لكل عزلة فطرية مدروسة.
 - يتم قياس طول كل من غمد الريشة والجذر الأطول (مم)، بعد أربعة أيام من الحضان، يتم التعبير عن النتائج بنسب مئوية لتثبيط عملية الإنبات ونسب تخفيض النمو الطولي بالمقارنة مع الحبوب غير الملقحة (الشاهدة).

2.7.2- اختبار القدرة الإراضية على الجزء القاعدي لشتلات القمح

تم إجراء هذه الدراسة وفق الطريقة المطبقة من طرف Khalifa و Matny (2013)، مع بعض التعديلات الطفيفة وذلك وفق الخطوات التالية:

- من أجل تحضير اللقاح الفطري، تنمى العزلات الفطرية المختبرة على وسط غذائي من بذور الشعير، حيث يوضع في كل حوالة ذات حجم 250مل، 54غ من بذور الشعير و 22مل ماء مقطر، يعقم المزيج في الموصدة (الأوتوكلاف)، ثم يلحق بخمس أقراص ذات قطر 6مم مأخوذة من مستعمرة العزلة الفطرية المدروسة عمرها 7 أيام ثم تحضن لمدة 15 يوم في درجة حرارة 25م°، ترج الحوالة يدويا كل 3 أو 4 أيام.
- يتم تعقيم التربة في جهاز الموصدة بعد رشها بقليل من الماء (التربة الرطبة تسمح بانتقال أفضل للحرارة بين جزيئات التربة)، باستعمال حرارة 120 م° وضغط 1.4 بار لمدة 20 د. تهدف عملية التعقيم الى التأكد من عدم وجود أي تداخلات مع كائنات حية أخرى موجودة مسبقا في التربة.
- يتم بذر كل إصيص (Pots)، ذو قطر 10سم، ببذور معقمة من أصناف القمح الثلاثة (بوسلام، واحة و GTAdur) بمعدل 5 بذرات في كل إصيص بعمق 4 الى 5 سم في التربة المعقمة مسبقا. يتم استعمال 3 تكرارات من كل تجربة.
- الإراضية الاصطناعية للتربة تتم بإضافة 2.5غ من اللقاح الفطري المختبر على عمق 2سم (فوق البذور المزروعة مسبقا) ثم يغطى بطبقة من التربة المعقمة سمكها 2سم (شكل 2.I).
- تزرع 3 إصيصات بالبذور المعقمة سطحيا فقط وتغطى بالتربة المعقمة، تستعمل هذه الأخيرة كشاهد.
- توضع جميع الإصيصات في مختبر تحت إضاءة جيدة مع تناوب 12س/12سا بين الضوء والظلام مع حرارة بين 18 و 20م°.
- يتم سقي الإصيصات، مرتين كل أسبوع بماء الحنفية، من أجل الحفاظ على النمو الجيد للنباتات.
- تخضع النباتات لمراقبة يومية من أجل تسجيل الملاحظات والأعراض أثناء كامل فترة التجربة المقدره بـ 45 يوما.
- في اليوم 46، يتم قياس كل من نسبة البروز للشتلات، طول الجذر الأطول وطول الجزء الهوائي وكذلك الوزن الرطب والجاف لكل من النظامين الجذري والهوائي.



شكل I. 2. مخطط يمثل إصيص يحتوي مختلف الطبقات التي تشرح طريقة دراسة تأثير الفطريات على الجزء القاعدي لشتلات القمح.

3.7.2- اختبار القدرة الإراضية على عدد ووزن حبات القمح في السنابل

تم تقدير تأثير أربع عزلات فطرية، هي الأكثر إراضية في الاختبارات السابقة، في الدفينة (البيت البلاستيكي)، على معدل كل من عدد ووزن حبات القمح الناتجة وفق الطريقة المقترحة من طرف Shin وآخرون (2014). تعقم بذور أصناف القمح "GTAdur"، "واحة" و"بوسلام"، سطحيا في محلول هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز 1.5% (ح/ح) لمدة 10د، تشطف البذور مرتين في الماء المقطر المعقم ثم توضع على ورق التجفيف المعقم. تخرس البذور في إصيصات مستديرة قطرها 15 سم وعمقها 25سم. تم زرع تسعة بذور، موزعة بالتساوي على ثلاث إصيصات. من أجل اختبار الإراضية، يتم حقن 10 µl من المعلق الكونيدي من كل عذلة فطرية مختبرة (بتركيز 4¹⁰x4 كونيديا/مل) بداخل غمد كل سنبله حيث تكون السنابل في مرحلة الإزهار. بالنسبة للشواهد السلبية تترك السنابل لتكتمل نضجها دون تلقيحها بالمعلق الكونيدي. تم تقييم التأثير على كل من معدل عدد ووزن حبات القمح المتشكلة بعد نضج السنابل من خلال حساب عدد وزن الحبات في كل سنبله.

8.2- الدراسة الإحصائية للنتائج

تمت مقارنة النتائج وتحليل التباين (ANOVA) باستعمال البرنامج SPSS الإصدار 25. متوسط الفروق المعنوية (Significance of mean differences) تم تعيينه باستعمال اختبار Duncan حيث تعتبر الاختلافات بأنها معنوية (Significant) إذا كانت أقل من 5% ($p < 0.05$) مع مجال الثقة مساو لـ 95%.

2- النتائج والمناقشة

1.2- عزل الفطريات الداخلية

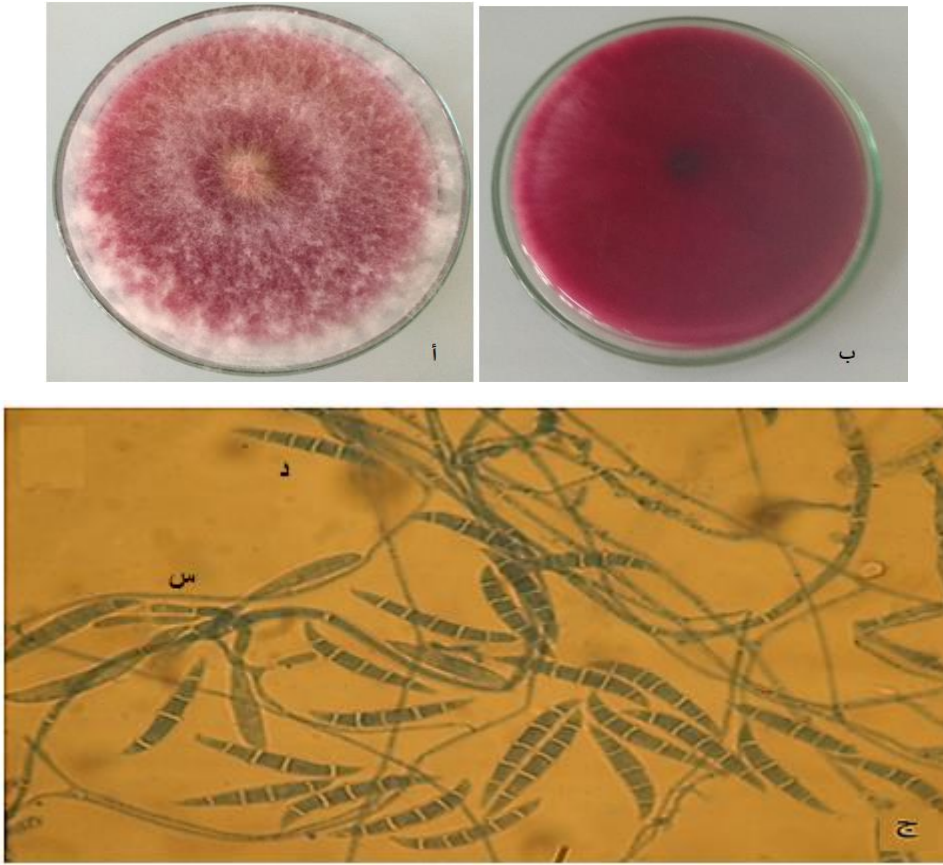
تم اجراء عملية العزل انطلاقا من بذور القمح المتحصل عليها بطريقة عشوائية من 59 منطقة من 7 ولايات من الشمال الشرقي الجزائري، تبين أن غالبية البذور المدروسة تحتوي على فطريات داخلية ولكنها من أنواع مختلفة. أكثر الأجناس المصادفة هي (من الأكثر الى الأقل): *Cladosporium sp*, *Alternaria sp*, *Aspergillus sp*, *Fusarium sp*, *Penicillium sp* و *Rhizopus sp*. تعتبر هذه الأنواع كثيرة التواجد في البذور بصفة عامة، وفي بذور القمح بصفة خاصة (Pathak and Zaidi, 2013 ; Hansraj et al., 2018). بالنسبة لجنس الـ *Fusarium* فقد تم الحصول على 14 عزلة، بعضها ينتمي لنفس النوع وبعضها الآخر ينتمي لأنواع مختلفة. اشتركت كل العينات في انتمائها الى جنس الـ *Fusarium* بسبب امتلاكها للخصائص العامة لهذا الجنس من حيث اللون أو شكل ونوع الكونيديات.

2.2- الوصف والتعريف المظهري للعزلات الفطرية

بالاعتماد على الخصائص المظهرية بالنسبة للمستعمرات على وسط PSA، أو بالنسبة للدراسة المجهرية على كل من الوسط SNA و/أو CLA يمكن وصف العزلات وتعريفها كما يلي:

- عزلات النوع *F. culmorum* (FC1 وFC2):

تنمو بشكل سريع تعطي على وسط الزرع PSA مستعمرات بلون يتغير من الأبيض نحو الوردى، تنتشر الـ Sporodochia في شكل كتلة بوغية مركزية (قطرها بين 1 و2سم) تكون في البداية برتقالية فاتحة ثم تصبح بنية داكنة مع التقدم في السن. الميسيليوم هوائي وفير مع تشكل صبغة حمراء متصلة مع وسط الزرع (شكل 3.I). الكونيديات الكبيرة قصيرة، سميقة وقليلة النغوس، الخلية القمية مستديرة أما الخلية القاعدية فتكون بشكل القدم (foot-shaped) بشكل غير تام أو مقطوعة (Notched)، تتشكل انطلاقا من الفيااليدات الأحادية أو المتفرعة على مستوى الـ Sporodochia. تحتوي الكونيديات الكبيرة على 3 الى 5 حواجز عرضية (Septum) ذات أبعاد 30-60 x 4-7 μm (شكل 3.I). عادة ما تشاهد الأبواغ الكلاميدية محمولة من طرف الكونيديات الكبيرة، أما الكونيديات الصغيرة فهي غير موجودة. تعود هذه المواصفات الى النوع *F. culmorum* حسب الوصف المقدم من طرف Toussoun و Nelson (1983)، Zillinsky (1983) ومن طرف Leslie و Summerell (2006).

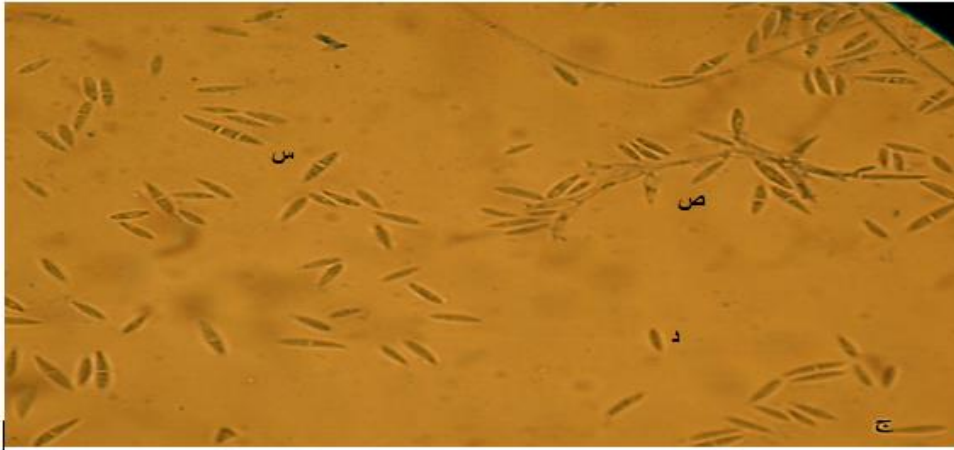
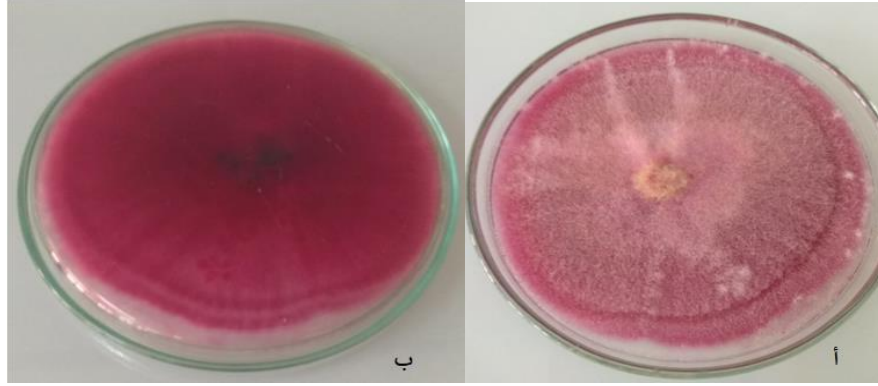


شكل 3.I. المستعمرة الخاصة بالعزلة FC1، (أ: وجه المستعمرة، ب: ظهر المستعمرة، ج: صورة بالمجهر الضوئي X400، د: الكونيديات الكبيرة، س: حاملات الكونيديات الأحادية).

- عزلة النوع "FCh" *F.chlamydosporum*

على وسط الزرع PSA، يكون النمو سريعاً، الميسيليوم كثيف بالكامل، ذو لون كركدي (Hibiscus) أو قرنفلي مع بعض الظلال الصفراء في الأجزاء القديمة من المستعمرة، أما ظهر العلبة فيظهر باللون الزهري الرمادي في الحواف ثم يتدرج إلى العنابي الفاتح (Burgundy) في المركز. في مستعمرة عمرها 7 أيام (شكل 4.I.أ، ب) تظهر الكونيديات الصغيرة والمتوسطة (حاجز عرضي أو اثنان فقط) وفيرة ذات شكل بيضوي، لا توجد Sporodochia حتى اليوم 15 من الزرع. الحامل الكونيدي (Conidiophore) قصير ومتفرع. الكونيديات الكبيرة نادرة، مستقيمة ومقسمة بحاجزين أو ثلاث حواجز عرضية. الأبواغ الكلاميدية نادرة وتحتاج وقتاً طويلاً للتشكل (حوالي 15 يوم) وتكون أحادية أو على شكل سلاسل (شكل 4.I.ج). لا تشكل الكونيديات

الصغير سلاسل. تعود هذه المواصفات الى النوع *F. chlamyosporum* حسب الوصف المقدم من طرف
Toussoun و Nelson (1976) ومن طرف Leslie و Summerell (2006).



شكل I.4. المستعمرة الخاصة بالعزلة FCh (أ: وجه المستعمرة، ب: ظهر المستعمرة، ج: صورة بالمجهر
الضوئي X400، د: الكونيديات الصغيرة، س: الكونيديات المتوسطة، ص: الحوامل الكونيدية).

- عزلات النوع *F. acuminatum* (Fa33 و Fa6.12، Fa6.25، Fa11.5، Fa12.1)

على وسط الزرع PSA، يكون النمو بطيئاً نسبياً، الميسيليوم أبيض كثيف صوفي المظهر (Floccose) مع صبغة زهرية الى عنابية فاتحة التي قد تميل الى الرمادي على الحواف. تتشكل Sporodochia في مركز المستعمرة (كتلة بوغية مركزية) وتكون ذات لون برتقالي الى بني داكن. تتشكل أيضا صبغة حمراء على الجيلوز (شكل I.5، ب).

من الناحية المجهرية، الكونيديات الكبيرة قليلة التقوس مع جدار سميك. الخلية القاعدية مميزة، على شكل قدم. الأبواغ الصغيرة موجودة ذات شكل مغزلي أو كلوي، غالبا مقسمة بجدار عرضي وحيد ونادرا غير

مقسمة، حامل الكونيديات يكون أحادي الفياليدات (شكل I.5ج). الأبواغ الكلاميدية تتشكل ببطء شديد. تعود هذه المواصفات الى النوع *F.acuminatum* حسب الوصف المقدم من طرف Burgess وآخرون (1994)، ومن طرف Leslie و Summerell (2006).

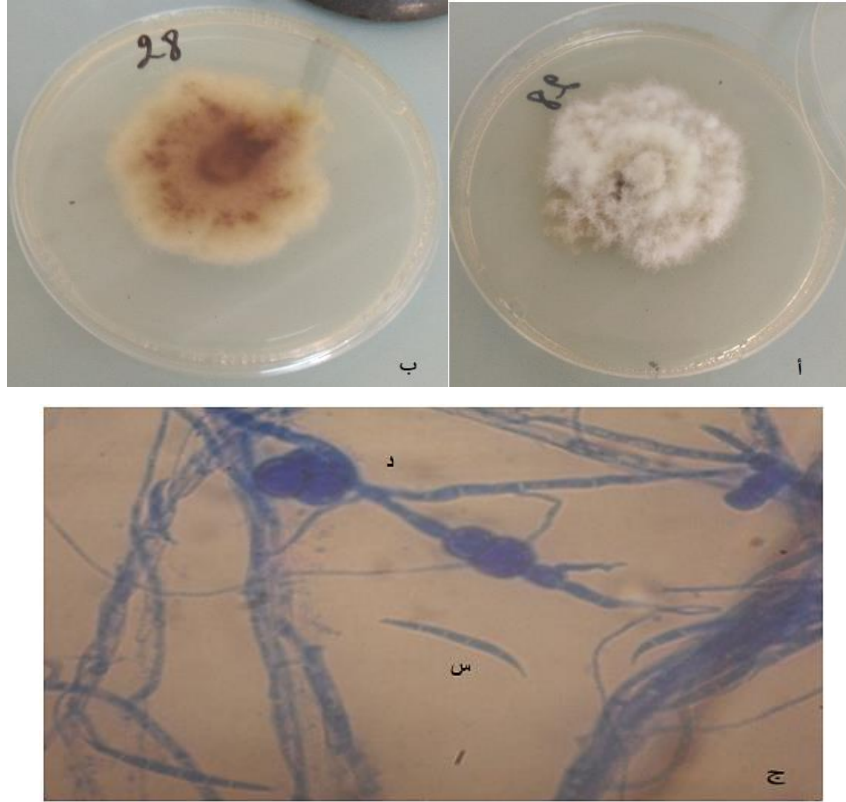


شكل I.5. المستعمرة الخاصة بالعزلة Fa12.1، (أ: وجه المستعمرة، ب: ظهر المستعمرة، ج: صورة بالمجهر الضوئي X400، د: الكونيديات الصغيرة، س: كونيدية كبيرة مع الحامل الكونيدي).

- عزلات النوع *F. equiseti* (Feq25، Feq49 و Feq28)

تنمو المستعمرات بشكل سريع نسبياً، على وسط الزرع PSA، تتميز بميسيليوم كثيف ذو لون أبيض في البداية تم تبدأ في التحول، مع التقدم في السن، الى اللون البني الفاتح تدريجياً خاصة في مركز المستعمرة، أما ظهر العلبة فتظهر المستعمرة على شكل تدرج من اللون البني الفاتح من المركز الى البني الفاتح جدا "Beige" في الحافة (شكل I.6أ، ب).

من الناحية المجهرية، تكون الكونيديات الكبيرة وفيرة خاصة في الـ Sporodochia التي تكون بلون بني فاتح، تمتلك الكونيديات الكبيرة جدارا سميكاً ولديها انحناء ظهري قوي وغالبا من 5 إلى 7 حواجز عرضية مع خلية قاعدية على شكل قدم جد مميزة وخلية قمية مستدقة (tapering). يتراوح طول الكونيديات الكبيرة بين 25 و 55 μm . تتشكل هذه الأخيرة انطلاقاً من حامل للكونيديات أحادي الفياليدات (شكل I.6ج). الكونيديات الصغيرة غير موجودة بينما تتشكل الأبواغ الكلاميدية بشكل سريع نسبياً على وسط SNA، موجودة بكثرة مع جدران سميكة وخشنة بارزة للغاية، ويتم إنتاجها بشكل فردي، في كتل أو سلاسل. تعود هذه المواصفات إلى النوع *F. equiseti* حسب الوصف المقدم من طرف Burgess و آخرون (1994)، ومن طرف Leslie و Summerell (2006).

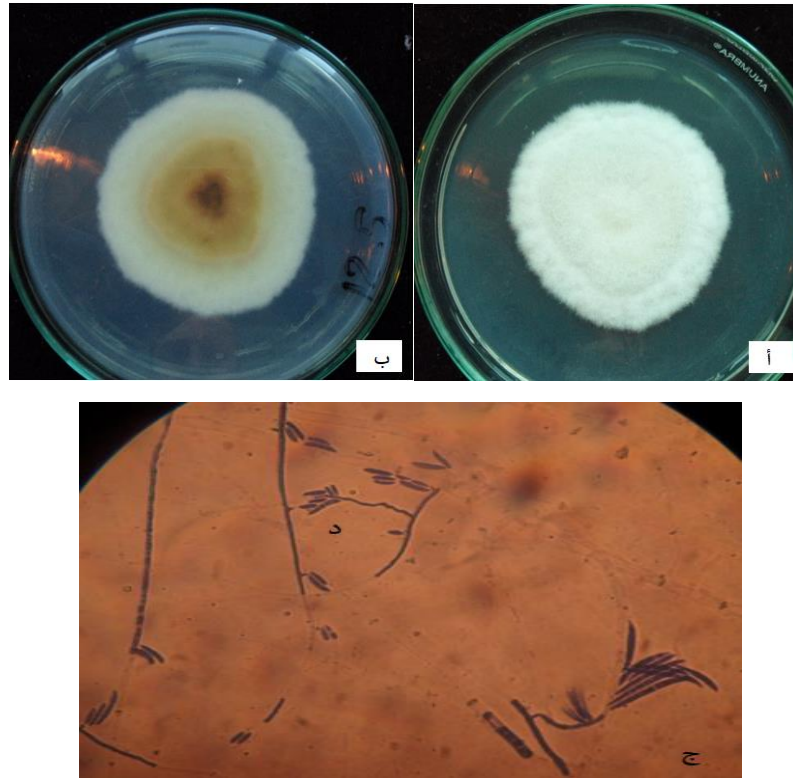


شكل I.6. المستعمرة الخاصة بالعزلة Feq25، (أ: وجه المستعمرة، ب: ظهر المستعمرة، ج: صورة بالمجهر الضوئي X400، س: كونيدية كبيرة، د: أبواغ كلاميدية).

- عزلات النوع *F.solani* (Fs12.5، Fs6.21 وFs35)

تكون المستعمرات، على وسط الزرع PSA، عموماً بيضاء وقد تميل إلى لون القشدة، الميسيليوم صوفي المظهر، تظهر الـ Sporodochia في شكل كتل بلون القشدة خاصة على الوسط CLA. لا تصنع صبغات في الجيلوز (شكل 7.I).

من الناحية المجهرية، تظهر الكونيديات الكبيرة بكثرة على مستوى الـ Sporodochia، طويلة وضيقة عموماً، مستقيمة ومتينة، تنتج عموماً انطلاقاً من فياليدات أحادية. تنتج الكونيديات الصغيرة على رؤوس كاذبة (False head) محمولة على فياليدات أحادية طويلة جداً مميزة للنوع. أحادية أو ثنائية الخلايا ذات شكل بيضوي، إهليجية أو كلوي (شكل 7.I ج). تتشكل الأبواغ الكلاميدية عادة على مستوى الميسيليوم بعد أسبوعين إلى ثلاث أسابيع من الزرع. تعود هذه المواصفات إلى النوع *F.solani* حسب الوصف المقدم من طرف Burgess وآخرون (1994)، ومن طرف Leslie و Summerell (2006).

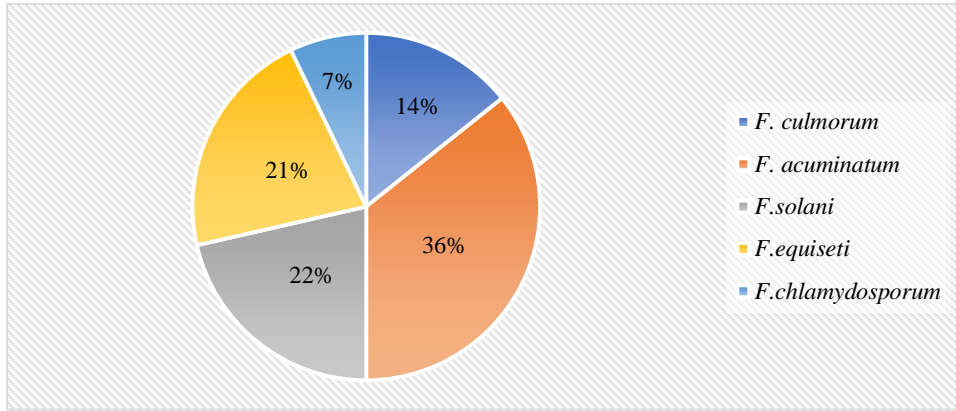


شكل 7.I. المستعمرة الخاصة بالعزلة Fs12.5، (أ: وجه المستعمرة، ب: ظهر المستعمرة، ج: الكونيديات الكبيرة، د: الرأس الكاذبة "False head").

أفضت الدراسة المظهرية والمجهريّة الى معرفة الأنواع الفطرية المعزولة (جدول 1.1)، وهي: *F. culmorum*، *F. chlamyosporum*، *F. acuminatum*، *F. equiseti* و *F. solani* بالاعتماد على مفاتيح التعرف الموصوفة من طرف Tousson و Nelsson (1976)، Booth (1971) ومن طرف Zillinsky (1983) وكذلك Leslie و Summerell (2006). من مجموع 14 عزلة تنتمي لجنس الـ *Fusarium*، لوحظ وجود اختلاف في نسبة التواجد بين الأنواع حيث ظهر النوع *F. acuminatum* بكثرة (335.71%) يليه النوعان *F. solani* و *F. equiseti* (21.43%) ثم النوع *F. culmorum* (14.29%) وأخيراً، النوع *F. chlamyosporum* (7.14%) (شكل 8.1).

جدول 1.1. مخلص نتائج تجارب العزل والتعريف المظهري للفطريات الداخلية التابعة لجنس الـ *Fusarium*.

رقم العينة	رمز العزلة	التعريف	النسبة العامة للتلوث %	الصف	المنطقة (البلدية)	الولاية
1	FC2	<i>F. culmorum</i>	18	VIT	الحوش	بسكرة
2	FC1	<i>F. culmorum</i>	93	VIT	أولاد منصور	المسيلة
3	FCh	<i>F. chlamyosporum</i>	41	WAHA	سيدي مبارك	برج بوعريريج
4	Fa12.1	<i>F. acuminatum</i>	64	GTA	تازولت	باتنة
5	Feq25	<i>F. equiseti</i>	33	WAHA	سيدي مبارك	برج بوعريريج
6	Feq49	<i>F. equiseti</i>	93	VIT	أولاد منصور	المسيلة
7	Fa11.5	<i>F. acuminatum</i>	71	GTA	تازولت	باتنة
4	Fs12.5	<i>F. solani</i>	64	GTA	تازولت	باتنة
8	Feq28	<i>F. equiseti</i>	49	GTA	الحمادية	برج بوعريريج
9	Fs6.21	<i>F. solani</i>	93	BOUS	عيون لعصافر	باتنة
9	Fa6.25	<i>F. acuminatum</i>	93	BOUS	عيون لعصافر	باتنة
10	Fa6.12	<i>F. acuminatum</i>	93	BOUS	عيون لعصافر	باتنة
11	Fa33	<i>F. acuminatum</i>	13	GTA	بابار	خنشلة
12	Fs35	<i>F. solani</i>	76	GTA	تازولت	باتنة

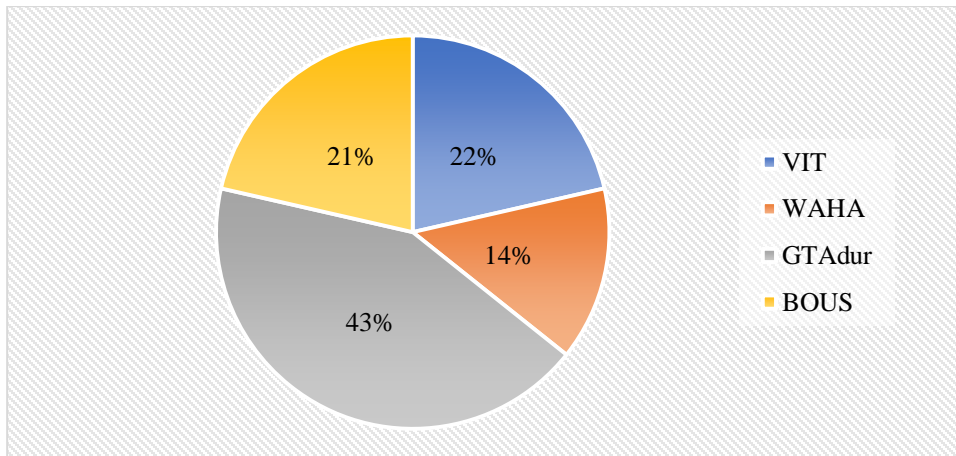


شكل 8.I. نسب أنواع الـ *Fusarium* المعزولة من العينات المصابة.

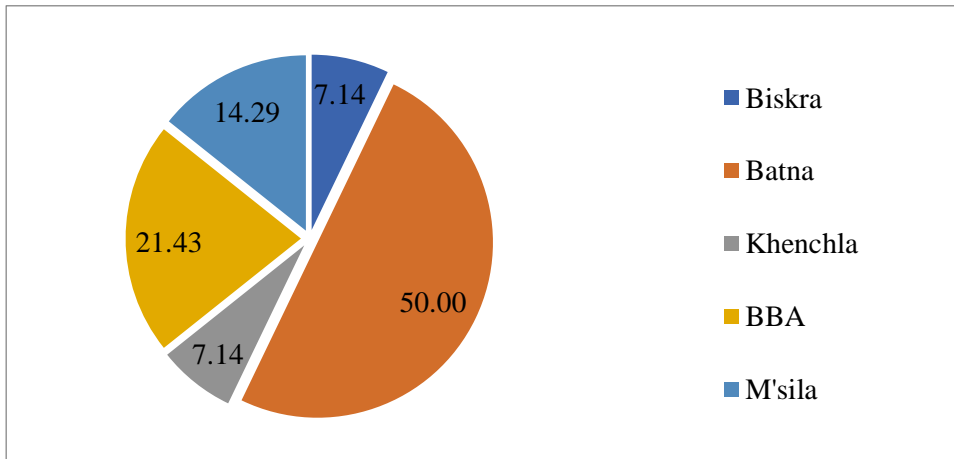
تختلف هذه النتيجة قليلا عما توصل اليه Strausbaugh وآخرون (2005) حيث أنهم توصلوا الى أن النوع *F. culmorum* هو الأكثر تواجدا في القمح، كما شرحوا أن تواجد أي نوع يتأثر بالظروف المناخية للمنطقة المتواجد فيها، خاصة منها الحرارة. من جهة أخرى، وافقت النتائج المتوصل اليها ما صرحت به Marín وآخرون (2012) أن النوعين *F. acuminatum* و *F. equiseti* يتواجدان بكثرة في الحبوب في جهات مناخية مختلفة، حيث يعملان على انتاج السموم الفطرية عليها. من ناحية أنواع القمح، أظهرت النتائج أن الصنف GTAdur كان الأكثر احتواء على عزلات الـ *Fusarium* (42.86%) متبوعا بالصنفين Vitron و"بوسلام" (21.43%) ثم يأتي أخيرا الصنف "واحة" (14.29%) (شكل 9.I). أما من ناحية التوزيع الجغرافي (شكل 11.I)، فقد أظهرت النتائج أن العينات المتحصل عليها من ولاية باتنة (بلدتي تازولت و عيون العصفار بالتحديد) كانت الأكثر احتواء على عزلات الـ *Fusarium* بنسبة قدرت بـ 50% من مجموع العينات، تبعثها العينات المتحصل عليها من ولاية برج بوعريريج التي احتوت على نسبة 21.43% من العينات، ثم العينات من ولاية المسيلة بنسبة 14.29% وأخيرا العينات المتحصل عليها من ولايتي بسكرة وخنشلة بنسبة 7.14% لكل منهما (شكل 10.I)، بالنسبة للعينات من ولايتي سطيف وميلة فلم يتم العثور فيها، على أي عزلة من الجنس *Fusarium*.

تختلف النتائج المتحصل عليها تماما مع ما توصلت اليه كل من Aouali و Douici-Khalifi (2009)، حيث أنهما لم يسجلا أي وجود لأمراض الـ *Fusarium* في الولايات التي قمنا بدراستها. على العكس من ذلك، وافقت النتائج المتحصل عليها ما توصلت Abdallah وآخرون (2019) من أن مرضي تعفن الجذور ولفحة السنابل، إضافة الى مسبباتهما، يتواجدان في كل من ولايتي باتنة (3 عزلات) و برج بوعريريج (عزلة واحدة). توافقت النتائج

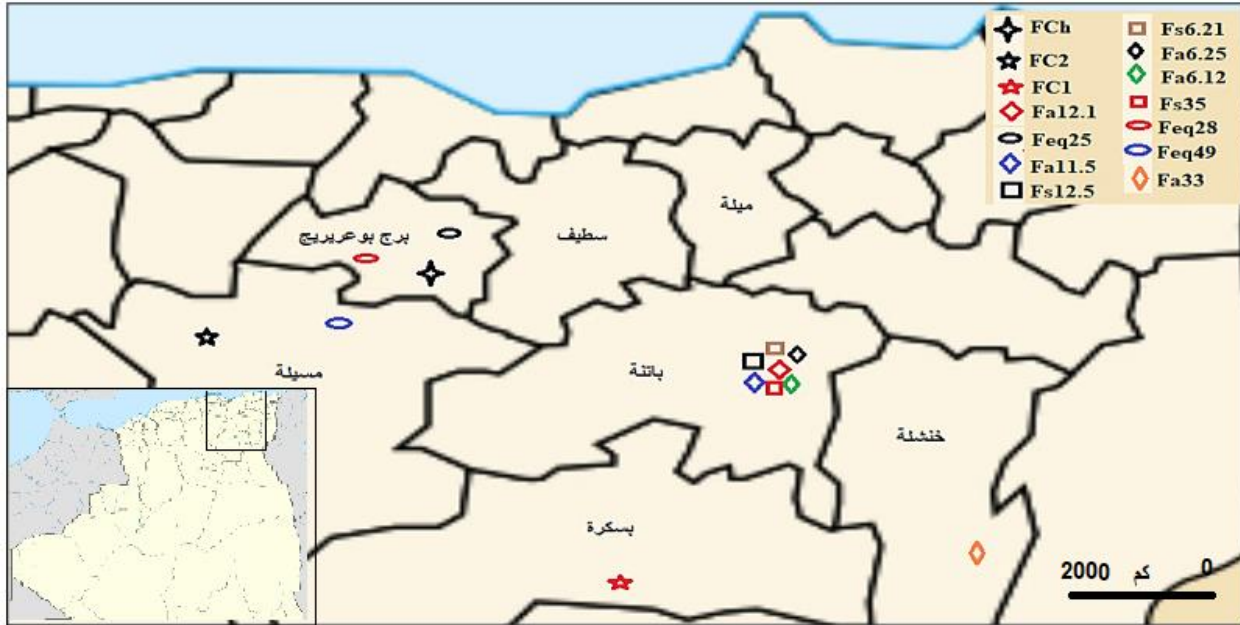
أيضا حول ولاية سطيف من حيث عدم الحصول على أي عزلة *Fusarium*. من جهة أخرى، اختلفت نتائجنا مع ما توصلت اليه هذه الأخيرة بخصوص ولاية ميلة، حيث أننا لم نتحصل على أي عزلة من هذه الولاية وتحصلت هي على 4 عزلات من نوعين مختلفين من الـ *Fusarium*.



شكل 9.I. نسبة إصابة أصناف القمح بالأنواع المختلفة من الـ *Fusarium*.



شكل 10.I. نسبة الإصابة بأنواع الـ *Fusarium* حسب الولايات المعنية.



شكل 11.I. التوزيع الجغرافي لمختلف عزلات الـ *Fusarium* التي تم الحصول عليها.

3.2- التعريف الجزيئي للعزلات الفطرية

تقليدياً، يتم فصل ووصف الأنواع المحتملة للـ *Fusarium*، اعتماداً على الخصائص المظهرية (خصائص المستعمرة) والمجهرية (الأبواغ والميسيليوم)، لكن في كثير من الحالات، تبقى هذه الطريقة محدودة وغير كافية بسبب عدم دقتها وعدم دقة الخصائص المعتمدة مثل الصبغات المنتجة أو شكل الأبواغ وترتيبها التي تكون مختلفة أحياناً حتى داخل النوع الواحد خاصة أو بالنسبة للأنواع المتشابهة عموماً.

من أجل التأكد من صحة النتائج المتوصل إليها من التعريف المظهري والمجهري، تم القيام بالتعريف الجزيئي لكن لـ 5 عزلات فقط من بين 14 عزلة المتعرف عليها، يرجع هذا إلى القدرة الإراضية، المميّزة نسبياً، التي سببتها هذه الأنواع المختارة.

بعد إرسال عينات الفطريات (العزلات) إلى مخبر "Gene Life Sciences"، تحصلنا على التسلسلات الخاصة بكل عزلة (ملحق 2)، حيث كان استعمال زوج البادئات EF-728E كافياً للتعرف على بعض العزلات (العزلة FC2 و Feq28) بينما استدعى التعرف على أخرى استعمال زوج ثانٍ من البادئات وهو ITS1 من أجل تأكيد النتائج (العزلات FC1، FCh، و Feq25). قورنت التسلسلات المتحصل عليها مع باقي التسلسلات الموجودة في بنك المورثات (Genbank)، باستعمال برنامج Blast فتحصلنا على النتائج الموضحة في الجدول 2.I.

اختلفت أطوال التسلسلات حسب نوع العزلة من جهة، ونوع البادئة من جهة أخرى، تميزت التسلسلات الناتجة عن استعمال ITS1 بأنها أطول نسبياً بالمقارنة مع التسلسلات الناتجة عن استعمال EF-728E (شكل 12.I). أكدت النتائج المتحصل عليها نتائج الدراسة المظهرية، بحيث توافقت جميع نتائج التعريف المظهري مع نتائج التعريف الجزيئي (نفس النوع الفطري). بعد تأكيد النتائج يمكننا التصريح لأول مرة بوجود النوعين *F.solani* و *F.chlamyosporum* في بذور القمح في الجزائر. يمكننا قول الكلام نفسه على النوع *F.solani* لكن تأكيد التعريف باستعمال تقنيات البيولوجيا الجزيئية يبقى مطلوباً.

الجدول 2.I. نتائج عملية التعريف الجزيئي للعزلات الفطرية باستعمال نوعين من أزواج البادئات.

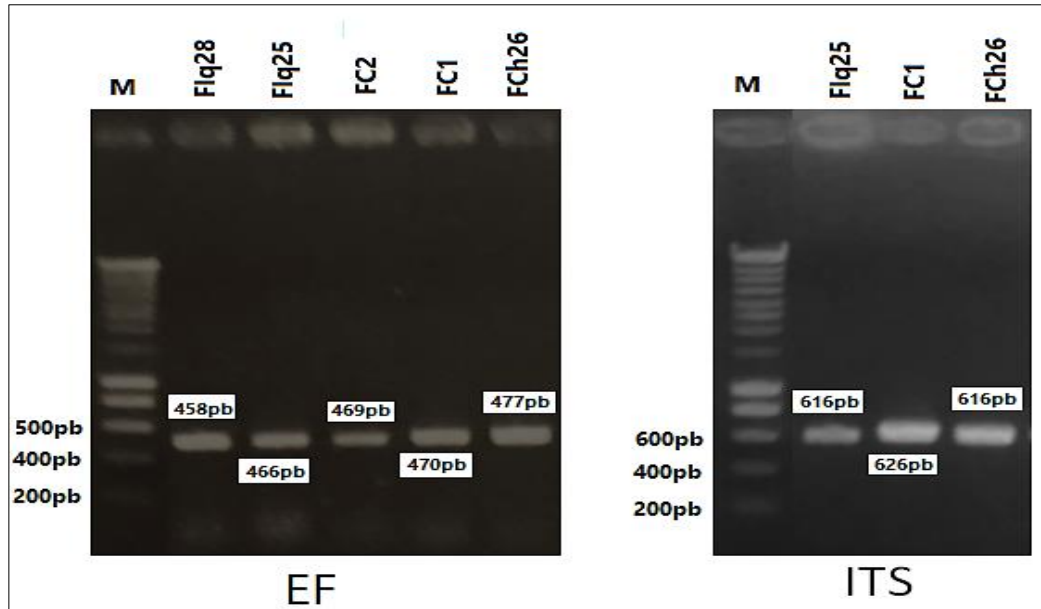
رقم العزلة	رمز العزلة	البادئة المستعملة	طول التسلسلة (عدد القواعد)	النوع الفطري	رقم الدخول (Genbank)	نسبة التشابه
2	FC1	EF-728E	470	<i>F. culmorum</i>	MT367594	100%
		ITS1	626	<i>F. culmorum</i>	MT077212	100%
1	FC2	EF-728E	469	<i>F. culmorum</i>	MT302379	100%
3	FCh	EF-728E	477	<i>F. microconidium</i>	MT344943	99.78%
				<i>F. chlamyosporum</i>		97.36%
		ITS1	616	<i>F. chlamyosporum</i>	MT077210	99.60%
5	Feq25	EF-728E	466	<i>F. incarnatum</i>	MT374408	99.76%
		ITS1	616	<i>F. equiseti</i>	MT077211	100%
9	Feq28	EF-728E	458	<i>F. equiseti</i>	MT263681	100%

4.2- دراسة تأثير درجة الحرارة ونوع وسط الزرع على نمو الفطريات المعزولة

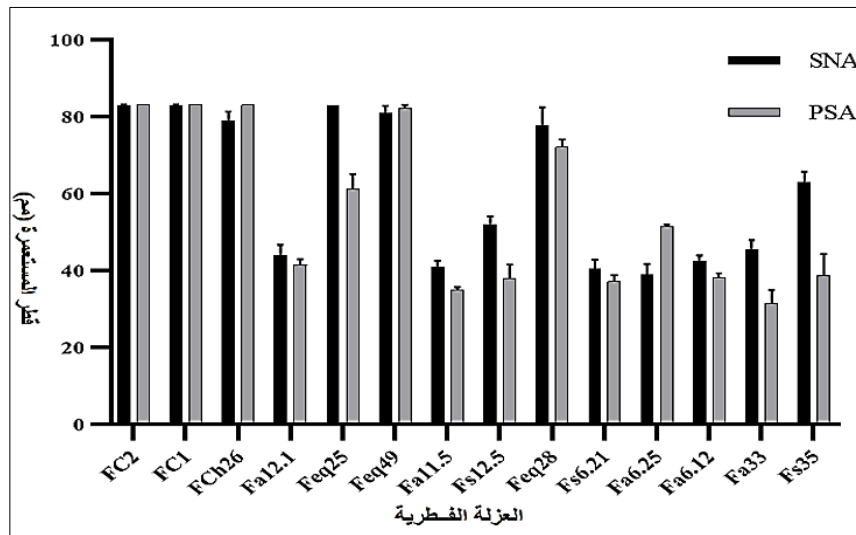
1.4.2- تأثير وسط الزرع على النمو وعلى إنتاج الأبواغ

بعد 7 أيام من الحضانة على درجة حرارة 28م°، تبين أن أقطار النمو كانت متقاربة كثيراً في كل من وسط الزرع PSA و SNA مع غالبية العزلات، بالنسبة لكل من العزلة Fa33، Feq28، Fs12.5، Fa11.5، Feq25 و Fs35 كان نموها أفضل قليلاً في الوسط SNA. على العكس من ذلك، كان نمو العزلتين FCh و Fa6.25 أفضل قليلاً في الوسط PSA (شكل 13.I). من الناحية الإحصائية، لوحظ وجود اختلاف معنوي بشكل كبير ($p < 0.001$) بين العزلات المدروسة فيما يخص نموها على كلا وسطي الزرع المستعملين (جدول 3.I). سجل

أكبر قطر نمو على الوسط SNA مع العزلات FC1، FC2، Feq25 و Feq49 بينما سجلت العزلات FC1، FC2، FCh و Feq49 أكبر قطر على الوسط PSA حيث تعدى قطر النمو 80 مم. على العكس من ذلك، تميزت العزلتين Fa33 و Fa6.25 بأصغر قطر نمو حيث لم يتعد 40 مم و 32 مم على الوسط SNA و PSA على الترتيب.



شكل I.12. صورة الهجرة الكهربائية على هلام Agarose لنواتج PCR للمنطقتين الجينيتين EF1 و ITS1 لعزلات الـ *Fusarium*.



شكل I.13. تأثير نوع وسط الزرع على النمو الفطري لمختلف عزلات الـ *Fusarium*.

تجدر الإشارة الى أن نوع النمو والميسيليوم كانا مختلفين كثيرا، يكون النمو على الوسط SNA سريعا نوعا ما حيث تمتد خيوط الميسيليوم مبتعدة عن نقطة الزرع (مركز المستعمرة) ومتباعدة فيما بينها (الميسيليوم منقطع وغير كثيف)، عكس النمو على الوسط PSA حيث يكون الميسيليوم كثيفا غالبا. يرجع الاختلاف في النمو الى تركيب (مكونات) وسط الزرع حيث يعتبر وسط الزرع PSA وسطا طبيعيا غنيا بالكربوهيدرات (النشا) التي تعتبر مصدرا مهما للطاقة والكربون بالنسبة للفطريات، من أجل ذلك يكون النمو كثيفا ولا يحتاج الفطر غالبا الى مد خيوط الميسيليوم كثيرا. على العكس من ذلك، يعتبر الوسط SNA وسطا فقيرا جدا من الكربوهيدرات خاصة، وعلية يحتاج الفطر الى مد خيوط الميسيليوم قدر الإمكان بحثا عن المغذيات اللازمة.

جدول 3.I. تحليل التباين لتأثير وسط الزرع على نمو عزلات الـ *Fusarium*.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
Modèle corrigé	32730,613 ^a	27	1212,245	191,949	,000
Constante	282312,741	1	282312,741	44701,794	,000
Cultur_Media	778,546	1	778,546	123,276	,000
Isolat	29551,336	13	2273,180	359,938	,000
Cultur_Media * Isolat	2400,731	13	184,672	29,241	,000
Erreur	353,666	56	6,315		
Total	315397,020	84			
Total corrigé	33084,279	83			

فيما يخص انتاج الأبواغ، فقد لوحظ أن الإنتاج، بعد 7 أيام من الزرع، يكون أفضل في الوسط SNA أي أن هذا الوسط يحفز انتاج الأبواغ بالمقارنة مع الوسط PSA الذي يكون فيه الإنتاج أقل أو حتى شبه منعدم مع بعض العزلات. يمكن تمييز بعض الاستثناءات حيث تميزت العزلات FC1، FC2، وFCh بالإنتاج الكثيف للأبواغ حيث تعدى عدد الأبواغ 10^5 بوغة/مل على كلا الوسطين المستعملين. من جهة أخرى، تميزت العزلات Feq25، Fa33 و Feq28، Feq49 بالإنتاج الضعيف جدا للأبواغ في الوسط PSA حيث لم يتعدى عدد الأبواغ المنتجة 100 بوغة/مل (جدول 4.I). من الناحية الإحصائية، لوحظ وجود اختلاف معنوي بشكل كبير ($p < 0.001$) بين العزلات المدروسة فيما يخص انتاج الأبواغ على كلا وسطي الزرع المستعملين (جدول 5.I). أظهر تحليل التباين عند عتبة 5% تأثيرا كبيرا للوسط على نمو وإنتاج الأبواغ للعزلات المختبرة، كما تحصلنا على تأثير

كبير من تفاعل وسط الزرع مع عزلات الـ *Fusarium* ($P < 0.001$)، هذا ما يؤكد أن وسط الزرع يؤثر على العزلات المختبرة من جهة النمو ومن جهة انتاج الأبواغ (الجدول 3.I و 5.I).

جدول 4.I. تأثير وسط الزرع على انتاج الأبواغ من طرف عزلات الـ *Fusarium*.

عدد الأبواغ PDA (بوغة/مل)	عدد الأبواغ SNA (بوغة/مل)	رمز العزلة الفطرية	النوع الفطري
3.2×10^4	64×10^4	FC2	<i>F.culmorum</i>
10^6	8.5×10^5	FC1	<i>F.culmorum</i>
33.6×10^5	22.7×10^5	FCh	<i>F.chlamydosporum</i>
1616	1.4×10^4	Fa12.1	<i>F.acuminatum</i>
158	32×10^4	Feq25	<i>F.equiseti</i>
733	1055	Feq49	<i>F.equiseti</i>
2066	11×10^3	Fa11.5	<i>F.acuminatum</i>
15×10^3	41×10^4	Fs12.5	<i>F.solani</i>
850	55×10^5	Feq28	<i>F.equiseti</i>
1040	85×10^3	Fs6.21	<i>F.solani</i>
3033	25×10^3	Fa6.25	<i>F.acuminatum</i>
1808	1.25×10^4	Fa6.12	<i>F.acuminatum</i>
253	2500	Fa33	<i>F.acuminatum</i>
29333	7×10^5	Fs35	<i>F.solani</i>

يمكن تفسير هذه النتائج، أيضا، بتركيب وسط الزرع حيث تلجأ الفطريات عادة، عند النقص الكبير للمغذيات على وسط الزرع، الى انتاج الأبواغ بشكل كبير باعتبارها الأشكال الأكثر مقاومة للظروف الصعبة، هذا ما يحدث بالضبط في الوسط SNA. على العكس من ذلك، يكون انتاج الأبواغ غالبا أقل على الوسط PSA باعتبارها وسطا غنيا بالمغذيات، إلا أن بعض العزلات تنتج عليه الكثير من الأبواغ، لكن هذا غالبا يحدث على مستوى المناطق الأكثر سنا من المستعمرة (مركز المستعمرة) حيث تنقص كمية الغذاء. ومن هنا يمكن الوصول الى أن لكل وسط مميزات تجعله صالحا لدراسة معينة: يستعمل الوسط PSA عادة من أجل التعرف على نوع الغزل الفطري وعلى الصبغات المنتجة، بينما يستعمل الوسط SNA من أجل الدراسة المجهرية التي تهتم بشكل كبير بالأبواغ من حيث شكلها وتجمعها. يعتبر هذا التفسير أمرا شائعا عند الباحثين في مجال تشخيص أنواع

الـ *Fusarium* المختلفة (Burgess *et al.*, 1994; Leslie and Summerell, 2006). تتفق النتائج المتوصل اليها مع ما توصلت اليه Abed (2017) حيث توصلت الى أن الوسط SNA يحفز انتاج الأبواغ بشكل كبير، عند أربعة أنواع من *F.oxysporum*، بالمقارنة مع الوسط PSA.

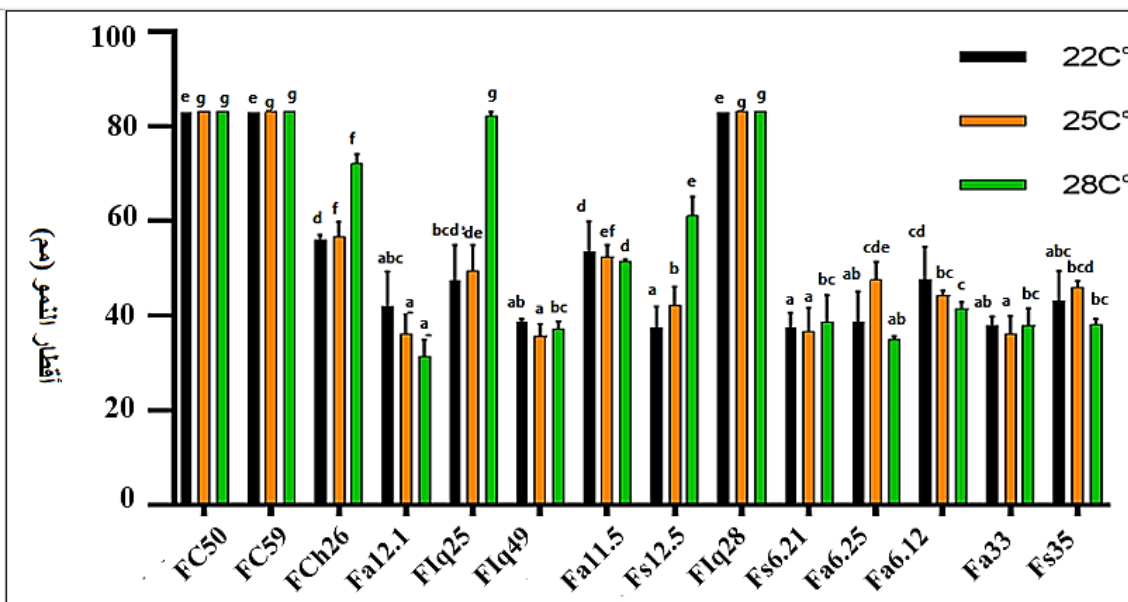
جدول 5.I. تحليل التباين لتأثير وسط الزرع على انتاج الأبواغ من طرف عزلات الـ *Fusarium*.

Variable dépendante: N_Spores					
Source	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
Modèle corrigé	4,630E+13 ^a	27	1,715E+12	151,193	,000
Constante	1,203E+13	1	1,203E+13	1060,761	,000
Cultur_Media	1,143E+11	1	1,143E+11	10,079	,002
Isolat	4,235E+13	13	3,258E+12	287,217	,000
Cultur_Media * Isolat	3,837E+12	13	2,952E+11	26,023	,000
Erreur	6,352E+11	56	1,134E+10		
Total	5,897E+13	84			
Total corrigé	4,694E+13	83			

2.4.2- تأثير درجة الحرارة على النمو الفطري

بعد 7 أيام من الزرع على الوسط PSA، تمكنت جميع العزلات المختبرة من النمو في مختلف درجات الحرارة المختبرة (22م°، 25م° و 28م°) ولكن بشكل متفاوت. تميزت العزلات FC1، FC2 و FCh بنموها الكبير جدا في درجات الحرارة المختلفة حيث تعدى قطر النمو 80 مم. تميزت العزلات Fs12.5، Fs6.21، Fs6.25 و Fs35 بنفس النمو في مختلف درجات الحرارة المستعملة لكن أقطار نموها لم تتعد 40 مم باستثناء العزلة 11 حيث وصل قطر نوحها الى 53 مم. سجل أفضل قطر للنمو مع العزلات 5، 6 و 9 في درجة الحرارة 28م° (شكل 14.I).

احصائيا، تباينت العزلات بشدة ($P < 0.001$) من حيث تأثرها بدرجة الحرارة، كما أظهر تحليل التباين عند عتبة 5% تأثيرا كبيرا لدرجة الحرارة على نمو العزلات المختبرة، كما تحصلنا على تأثير كبير من تفاعل درجة الحرارة مع عزلات الـ *Fusarium* ($P < 0.001$)، هذا ما يؤكد أن درجة الحرارة تؤثر على العزلات المختبرة من حيث كمية (أقطار) النمو (الجدول 6.I). بينت الدراسات أن درجات الحرارة المعتدلة (بين 20م° و 30م°) تكون ملائمة لنمو وانتشار الكثير من الفطريات من بينها عدة أنواع ممرضة من الـ *Fusarium* (Scott *et al.*, 2010). تعتبر النتائج المتوصل اليها موافقة لنتائج هذه الأبحاث حيث كانت درجة الحرارة الموافقة للنمو الأمثل بين 25م° و 28م°.



شكل 14.I. تأثير درجة الحرارة على معدلات أقطار النمو لعزلات الـ *Fusarium* بعد 7 أيام من الحضانة. الأعمدة ذات اللون الواحد، المؤشرة بنفس الحرف (الأحرف) تعتبر غير مختلفة احصائيا حسب اختبار Duncan في العتبة 5%.

جدول 6.I. تحليل التباين لتأثير درجة الحرارة على نمو عزلات الـ *Fusarium*.

Variable dépendante: Growth_mm					
Source	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
Modèle corrigé	42191,711 ^a	41	1029,066	72,668	,000
Constante	356988,060	1	356988,060	25208,866	,000
Temp	271,358	2	135,679	9,581	,000
Isolat_N	37839,975	13	2910,767	205,545	,000
Temp * Isolat_N	4080,378	26	156,938	11,082	,000
Erreur	1189,542	84	14,161		
Total	400369,313	126			
Total corrigé	43381,252	125			

5.3- اختبار القدرة الإمراضية لعزلات الـ *Fusarium*

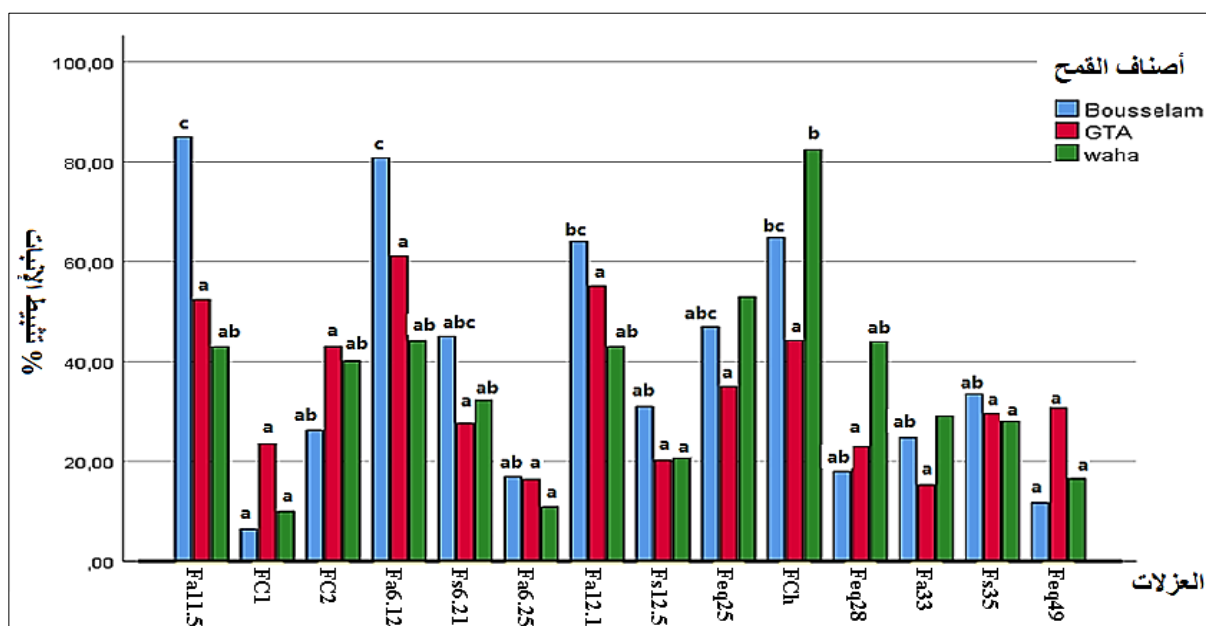
من أجل معرفة العزلات الممرضة، لنبات القمح، من بين العزلات التي تم الحصول عليها من عملية العزل والتعريف، تم إجراء اختبارين مختلفين أحدهما لتقدير القدرة الإمراضية على غمد الريشة والجذير الأولي، أما الاختبار الثاني فلتقدير القدرة الإمراضية على الجزء القاعدي لشتلات القمح لثلاث أصناف من القمح وهي: بوسلام، واحة وGTAdur.

1.5.3- اختبار القدرة الإمراضية على ظهور ونمو غمد الريشة

تم في هذا الاختبار دراسة القدرة الإمراضية لعزلات الـ *Fusarium*، وتم التعبير عن درجة العدوانية عن طريق حساب النسبة المئوية لتخفيض الإنبات وتخفيض طول غمد الريشة مقارنة بالبذور الشاهدة غير الملقحة. تنوعت العدوانية حسب نوع القمح، نوع العزلة، بل تنوعت حتى بين عزلات النوع الواحد. أظهرت بعض العزلات عدوانية شديدة، بعضها الأخر عدوانية متوسطة وأخرى عدوانية ضعيفة.

فيما يخص تأثير العزلات على معدل الإنبات، مع الصنف "بوسلام"، تبين أن العزلة Fa11.5 هي الأكثر عدوانية بمعدل تخفيض إنبات وصل 85%، وأن العزلة FC1 هي الأقل عدوانية بمعدل تخفيض إنبات قدر بـ 6.5%، أما مع الصنف GTAdur فقد كانت العزلة Fa6.12 هي الأكثر عدوانية بمعدل تخفيض إنبات قدر بـ 61%، وكانت العزلتان Fa6.25 و Fa33 الأقل عدوانية بمعدل تخفيض إنبات قدر بـ 16% و 15% على الترتيب. مع الصنف "واحة"، كانت العزلة FCh هي الأكثر عدوانية بمعدل تخفيض إنبات وصل إلى 82% بينما كانت العزلتين FC2 و Fa6.25 الأقل عدوانية بمعدل تخفيض إنبات قدر بحوالي 10% لكل منهما (شكل 15.I).

أظهر تحليل التباين لنسبة الإنبات، من جهة، وجود اختلاف معنوي بشكل كبير جدا ($P < 0.001$) بين العزلات المختبرة فيما بينها، ومن جهة أخرى وجود اختلاف معنوي ($P < 0.05$) بين العزلات FCh، Fa12.1، Fa25، Fa11.5 و Fa6.12 والشواهد غير الملقحة (اختبار Tukey). وهذا يدل على أن العزلات لم تكن كلها مضرّة بعملية الإنبات، بل فقط العزلات المذكورة آنفا (جدول 7.I).



شكل I.15. تأثير عزلات الـ *Fusarium* على إنبات بذور القمح (نسبة تثبيط الإنبات*).

* القيم عبارة عن معدلات لأربع تكرارات، كل تكرار عبارة عن معدل قياسات خمس وعشرين بذرة. الأعمدة ذات

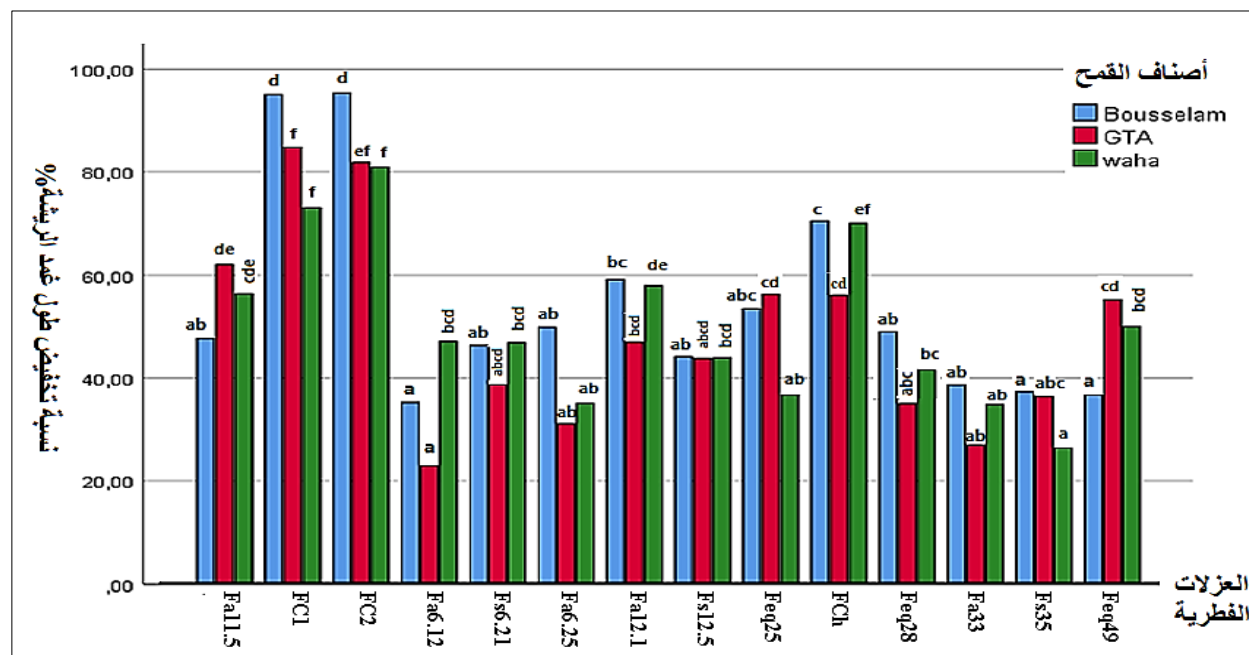
اللون الواحد، المؤشرة بنفس الحرف (الأحرف) تعتبر غير مختلفة احصائيا حسب اختبار Duncan في العتبة 5%.

جدول I.7. تحليل التباين لتأثير عزلات الـ *Fusarium* على إنبات بذور القمح.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
Modèle corrigé	79849,572 ^a	44	1814,763	1,975	,002
Constante	208114,681	1	208114,681	226,502	,000
Variety	870,647	2	435,324	,474	,624
isolate	63715,438	14	4551,103	4,953	,000
Variety * isolate	15263,487	28	545,125	,593	,946
Erreur	124040,848	135	918,821		
Total	412005,101	180			
Total corrigé	203890,419	179			

فيما يخص تأثير العزلات على طول غمد الريشة، مع الصنف "بوسلام"، تبين أن العزلتين FC1 و FC2 هما الأكثر عدوانية بمعدل تخفيض طول غمد الريشة قارب 95% لكل منهما، وأن العزلتين Fa6.12 و Feq49 هما الأقل عدوانية بمعدل قدر بـ 35% لكل منهما، أما مع الصنف GTAdur فقد كانت العزلة FC2 هي الأكثر عدوانية بمعدل تخفيض طول غمد الريشة قدر بـ 85%، وكانت العزلة Fa6.12 الأقل عدوانية بمعدل قدر بـ

22%. مع الصنف "واحة"، كانت العزلة FC1 هي الأكثر عدوانية بمعدل تخفيض طول غمد الريشة قارب 82% بينما كانت العزلة Fa33 الأقل عدوانية بمعدل قدر بحوالي 26% (شكل 16.I).



شكل 16.I. تأثير عزلات الـ *Fusarium* على النمو الطولي لغمد الريشة (نسبة تخفيض طول غمد الريشة*).

* القيم عبارة عن معدلات لأربع تكرارات، كل تكرار عبارة عن معدل قياسات خمس وعشرين بذرة. الأعمدة ذات اللون الواحد، المؤشرة بنفس الحرف (الأحرف) تعتبر غير مختلفة احصائيا حسب اختبار Duncan في العتبة 5%.

أظهر تحليل التباين لنمو طول غمد الريشة، من جهة، وجود اختلاف معنوي ($p < 0.05$) بين أصناف القمح واختلاف معنوي بشكل كبير جدا ($P < 0.001$) بين العزلات المختبرة فيما بينها ومن جهة أخرى، بين العزلات المختبرة والشواهد غير الملقحة (اختبار Tukey). وهذا يدل على أن كل العزلات المختبرة كانت مضرّة بشكل معنوي بعملية نمو طول غمد الريشة، كما يدل أن حساسية أصناف القمح كان مختلفا حيث ظهر أن الصنف "بوسلام" كان الأكثر حساسية متبوعا بالصنف "واحة" ثم الصنف "GTA". بما أن التفاعل "صنف القمح-العزلة الفطرية" كان معنويا أيضا ($P < 0.05$) فهذا يدل على أن صنف القمح قد يؤثر في عدوانية العزلة على طول غمد الريشة (جدول 8.I).

جدول 8.I. تحليل التباين لتأثير عزلات الـ *Fusarium* على النمو الطولي لغمد الريشة.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
Modèle corrigé	82126,991 ^a	44	1866,523	12,983	,000
Constante	405942,620	1	405942,620	2823,581	,000
Variety	907,391	2	453,695	3,156	,046
isolate	74630,802	14	5330,772	37,079	,000
Variety * isolate	6588,798	28	235,314	1,637	,034
Erreur	19408,778	135	143,769		
Total	507478,390	180			
Total corrigé	101535,769	179			

أظهرت الدراسة حول تأثير عزلات الـ *Fusarium* على ظهور ونمو غمد الريشة وجود تنوع واختلاف في عدوانية مختلف العزلات المختبرة. وجد في بعض الحالات، أن العزلات من النوع الواحد تختلف من حيث عدوانيتها سواء تجاه ظهور أو نمو غمد الريشة.

بخصوص التأثير على عملية الإنبات، تبين أن كل من النوعين *F. chlamydosporum* (العزلة FCh) و *F. acuminatum* (العزلات Fa11.5، Fa6.12 و Fa12.1) كانا الأكثر عدوانية، بينما كان النوعان *F. culmorum* (ممثلا بالعزلة FC1) و *F. acuminatum* (ممثلا بالعزلة Fa6.25) هما الأقل عدوانية. وعليه، يمكن تقسيم عزلات النوع *F. acuminatum* إلى قسمين: الأول، ويضم العزلات Fa11.5، Fa6.12 و Fa12.1، يتميز بالعدوانية الكبيرة (بين 54% و 62%) تجاه إنبات بذور القمح. الثاني، ويضم العزلات Fa33 و Fa6.25، يتميز بالعدوانية الضعيفة (بين 14% و 23%) تجاه عملية الإنبات.

على العكس من ذلك، بالنسبة للتأثير على طول غمد الريشة، لوحظ أن النوع *F. culmorum* كان الأكثر عدوانية (بمعدل فاق 84% لكلا العزلتين)، كما أن العزلة Fa6.12 (من النوع *F. acuminatum*) أصبحت ضمن الثلاث عزلات الأقل عدوانية بالإضافة إلى العزلة Fs35 (من النوع *F. solani*) التي كانت هي الأضعف (أقل من 35%).

بما أن غالبية أنواع الـ *Fusarium* تعتبر اختيارية المعيشة (بين الترممية والطفيلية)، يمكن تفسير هذه النتائج بأن العزلات التي تكون عدوانية على عملية الإنبات، وضعيفة العدوانية على نمو غمد الريشة، تميل إلى المعيشة الترممية أكثر من المعيشة الطفيلية، على عكس العزلات التي تكون عدوانية على نمو غمد الريشة وضعيفة العدوانية على عملية الإنبات. توصلت Chekali وآخرون (2011)، أن تلقيح بذور القمح (6 أصناف مختبرة) بالنوع *F. culmorum* يمنع عملية الإنبات بنسب بين 40% و 60% حسب نوع القمح. صرح Hudec

(2007) أن كل من *F. culmorum* و *F. graminearum* كانا الأكثر عدوانية تجاه نمو غمد الريشة عند القمح والشعير بنسبة تخفيض للطول قدرت بـ 91.32% للأول و 78.32% للثاني. درست Abdellah وآخرون (2019) أيضا، عدوانية عزلات الـ *Fusarium* على نمو غمد الريشة، فوجدت أن النوع *F. culmorum* هو الأكثر عدوانية بمعدلات بين 65% و 100%، تعتبر هذه النتائج موافقة وقريبة من النتائج التي توصلنا إليها بخصوص النوع *F. culmorum*. بالمقابل، تعتبر النتائج المتوصل إليها أقل مما تصلحت إليه Mnasri وآخرون (2016)، حيث وجدت أن عزلات *F. culmorum* يمكنها تثبيط بروز غمد الريشة بمعدلات بين 84% و 96%. من جهة أخرى، توصلت Shikur وآخرون (2017) الى أن بعض عزلات *F. acuminatum* تكون متوسطة العدوانية (الدرجة 3 من 5 درجات من العدوانية) تجاه شتلات القمح مسببة اسوداد منطقة التاج، على الرغم من أن هذا النوع يكون غير ممرض غالبا. كما صرح Smiley و Patterson (1996) أن بعض عزلات *F. acuminatum* يمكنها قتل شتلات القمح في الدفيئات. وهذا أيضا يوافق النتائج المتوصل إليها، حيث أن بعض عزلات هذا النوع كان غير عدواني، بشكل كبير، على عكس عزلات أخرى. توصلت Shikur وآخرون (2017) أيضا، الى أن العزلات التابعة للنوع *F. solani* غير ممرضة أو، على الأكثر، ضعيفة الإمراضية (الدرجة 2 من 5 درجات من العدوانية)، هذه النتائج أيضا موافقة للنتائج المتوصل إليها بخصوص هذا النوع. تميز النوع *F. chlamyosporum* بالعدوانية القوية تجاه كل من عملية الانبات و نمو غمد الريشة (بين 63% و 65%). يتواجد هذا النوع عادة في البذور ككائن مترمم (Leslie and Summerell, 2006)، لكنه في هذه الدراسة، ظهر كنوع جد عدواني على انبات ونمو غمد الريشة، تعتبر هذه النتيجة فريدة من نوعها حيث لا توجد أي دراسة تبين أن هذا النوع يمكن أن يكون ممرضا لنبات القمح، رغم أنه قد يكون ممرضا لعدة نباتات أخرى مثل جذور الرز الحلبي (Lazreg et al., 2014)، نبات البيدة "*Coleus forskohlii*" (Singh et al, 2009) وغيرها. بالنسبة للنوع *F. equiset* فقد كانت العزلة Feq25 أكثر عدوانية نسبيا بالمقارنة بالعزلة Feq28، سواء من ناحية تخفيض نسبة الانبات أو من ناحية تخفيض طول غمد الريشة. تعتبر النتائج المتحصل عليها أكبر قليلا مما توصل اليه Sakr (2017) حيث خفضت عزلة *F. equiset* التي استعملها نسبة الانبات لستة أنواع من القمح بين 18% و 27%. توصل أيضا باستعمال نفس العزلة الى تخفيض طول غمد الريشة بنسب بين 55% و 60%، وهي قيم أكبر قليلا من القيم المتحصل عليها.

2.5.3- اختبار القدرة الإراضية على شتلات القمح

يهدف تقييم عدوانية عزلات الـ *Fusarium*، تم متابعة نمو بذور القمح لمدة 45 يوم بشكل يومي مع تسجيل الملاحظات. بعد اقتلاع الشتلات، يتم قياس طول النظامين الجذري (RSL) والنباتي (VSL) وكذلك الوزن الجاف والرطب لكل منهما.

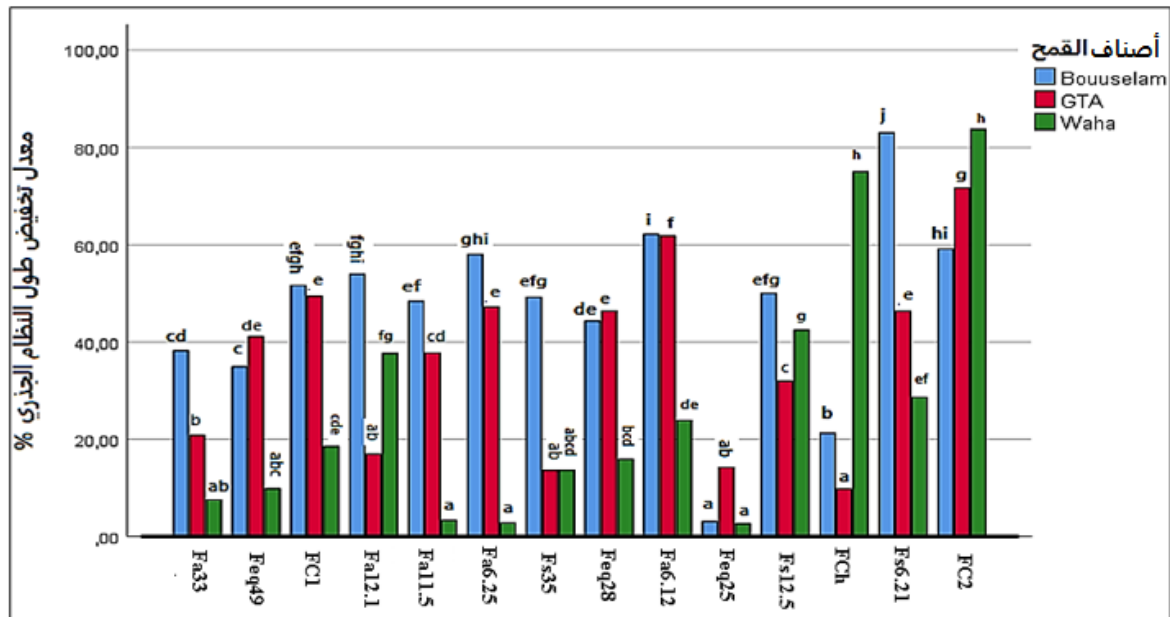
بالنسبة للشاهد السلبي، لم تسجل أية أعراض طويلة أيام التجربة. بالنسبة للشتلات المتأتية من بذور مزروعة في تربة ملقحة، بدأ ظهور الأعراض ابتداء من اليوم 15 الى اليوم 20 بعد البذر على شكل اسوداد (Blackening) على مستوى عنق الساق ثم يتطور مع مرور الأيام نحو الساق ثم يؤدي الى اصفرارا وذبول الشتلة. بعد 45 يوم، أي بعد اقتلاع الشتلات، لوحظ أن الجذور تكون ذات تفرع ضعيف وطول قصير بالمقارنة مع الجذور الشاهدة الموافقة. تختلف هذه الملاحظات حسب صنف القمح والعزلة الفطرية المطبقة (شكل 17.I). لوحظ أيضا اختلاف في الأعراض بين العزلات المنتمية لنفس النوع.

بالنسبة لمعدل تخفيض طول النظام الجذري "RSL"، وجد أن العزلة الأكثر عدوانية مع الصنف "بوسلام"، هي العزلة Fs6.21 بمعدل قدر بـ 83% وأن العزلة الأقل عدوانية هي العزلة 5 بمعدل قدر بـ 3%، أما باقي العزلات فقد كانت المعدلات محصورة بين 21% و 62%. أما مع الصنف "GTA"، فقد كانت العزلة FC1 هي الأكثر عدوانية بمعدل 71.6% وكانت العزلة FCh هي الأقل عدوانية بمعدل 9.8%، أما باقي العزلات فقد كانت المعدلات محصورة بين 13.56% و 61.78%. مع الصنف "واحة"، تميزت العزلتين FC1 و FCh بأكبر عدوانية قدرت بـ 83.68% و 75% على الترتيب. على العكس من ذلك، كانت العزلات Fa6.25، Feq25 و Fa11.5 هي الأقل عدوانية بمعدل وصل الى 2.64%، 2.74%، و 3.34% على الترتيب، أما باقي العزلات فقد كانت المعدلات محصورة بين 7.49% و 75% (شكل 18.I).

من جهة أخرى، أسفرت الدراسة الإحصائية على وجود اختلاف معنوي بشكل كبير جدا ($P < 0.001$) بين كل من: أصناف القمح فيما بينها، العزلات فيما بينها وبين العزلات والشواهد غير الملقحة (Tukey)، ماعدا العزلة Feq25 التي كان الاختلاف معها غير معنوي ($P > 0.05$). تدل هذه النتائج، من جهة، على أن العدوانية على طول الجذور تختلف بشكل كبير من عزلة الى أخرى، ومن جهة أخرى أن هذه العدوانية تختلف حسب صنف القمح المختبر (صنف القمح يؤثر في العدوانية) حيث لوحظ أن الصنف "بوسلام" كان الأكثر حساسية متبوعا بالصنف "GTA" ثم الصنف "واحة". يعتبر تأثير العزلات الفطرية على طول النظام الجذري تأثيرا قويا ومعتبرا إذا ما قورنت النتائج بالشتلات غير الملقحة (جدول 9.I).



شكل 17.I. الأعراض المسببة من طرف العزلة FC2، المتمثلة في نخر، اصفرار وذبول الجزء الهوائي مع قصر وقلة تفرع الجذور.



شكل 18.I. تأثير عزلات الـ *Fusarium* على طول النظام الجذري (معدل التخفيض)*.

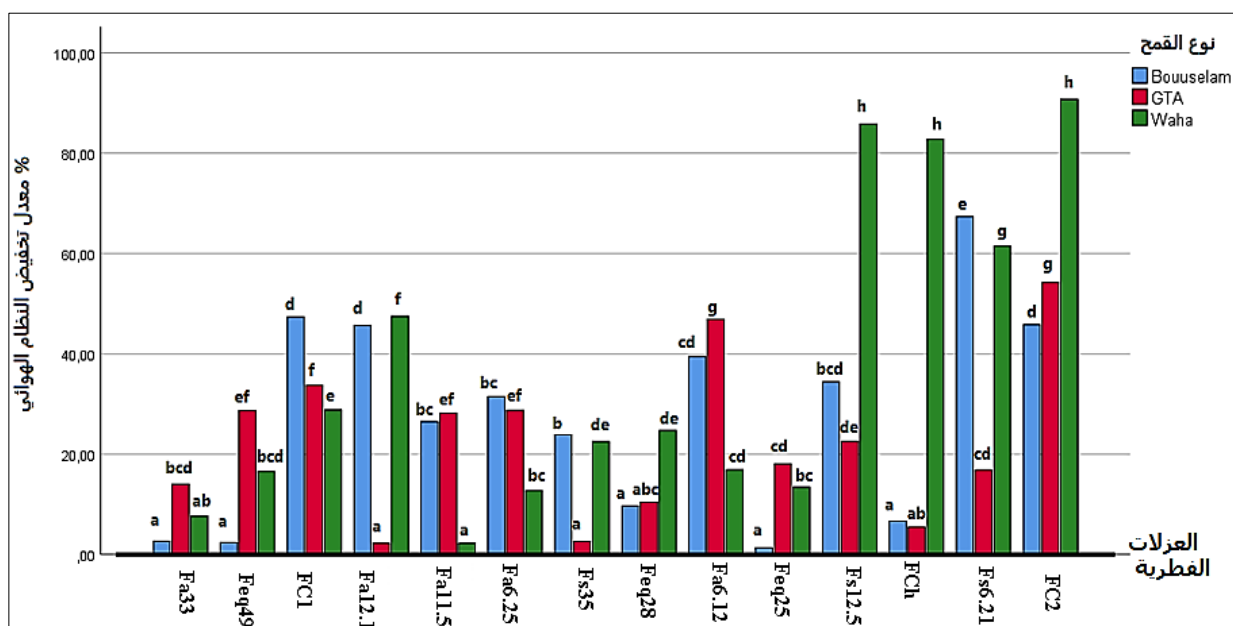
*القيم عبارة عن معدلات لثلاث تكرارات، كل تكرار عبارة عن معدل قياسات خمس شتلات. الأعمدة ذات اللون الواحد، المؤشرة بنفس الحرف (الأحرف) غير مختلفة معنويًا حسب اختبار Duncan في العتبة 5%.

جدول 9.I. تحليل التباين لتأثير عزلات الـ *Fusarium* على طول النظام الجذري.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
Modèle corrigé	74585,037 ^a	44	1695,114	67,764	,000
Constante	156192,628	1	156192,628	6243,987	,000
Variety	8497,314	2	4248,657	169,845	,000
Isolate	38250,751	14	2732,196	109,223	,000
Variety * Isolate	27836,972	28	994,178	39,743	,000
Erreur	2251,340	90	25,015		
Total	233029,005	135			
Total corrigé	76836,377	134			

بالنسبة لمعدل تخفيض طول النظام الهوائي "VSL"، وجد أن العزلة الأكثر عدوانية مع الصنف "بوسلام"، هي العزلة Fs6.21 أيضا لكن بمعدل قدر بـ 67.36% وأن العزلات الأقل عدوانية هي Feq25، Feq49، Fa33، FCh، و Feq28 (نفس المجموعة الإحصائية) بمعدل قدر بـ 1.39%، 2.47%، 2.71%، 6.73% و 9.76% على التوالي. أما باقي العزلات فقد كانت المعدلات محصورة بين 23.91% و 47.39%. أما مع الصنف "GTA"، فقد كانت العزلتين FC2 و Fa6.12 هما الأكثر عدوانية بمعدل 54.3% و 46.95% على الترتيب، بينما كانت العزلتين Fa12.1 و Fs35 هما الأقل عدوانية بمعدل 2.31% و 2.66% على الترتيب، أما باقي العزلات فقد كانت المعدلات محصورة بين 5.55% و 33.74%. مع الصنف "واحة"، تميزت العزلات FCh، Fs12.5 و FC2 بأكبر عدوانية حيث قدرت بـ 82.77%، 85.83% و 90.8% على الترتيب. على العكس من ذلك، كانت العزلة Fa11.5 هي الأقل عدوانية بمعدل وصل الى 2.31%، أما باقي العزلات فقد كانت المعدلات محصورة بين 7.65% و 61.5% (شكل 19.I).

من جهة أخرى، أظهرت الدراسة الإحصائية وجود اختلاف معنوي بشكل كبير جدا ($P < 0.001$) بين كل من: أصناف القمح فيما بينها، العزلات فيما بينها وبين العزلات والشواهد غير الملقحة (Tukey)، ماعدا العزلة Feq25 حيث كان الاختلاف بينها وبين الشواهد معنويا فقط ($P < 0.05$)، أما العزلة Fa33 فقد كان الاختلاف بينها وبين الشواهد غير معنوي ($P > 0.05$). تدل هذه النتائج، من جهة، على أن العدوانية على طول النظام الهوائي تختلف بشكل كبير من عزلة الى أخرى، ومن جهة أخرى أن هذه العدوانية تختلف حسب صنف القمح المختبر (صنف القمح يؤثر في العدوانية) حيث لوحظ أن الصنف "واحة" كان الأكثر حساسية متبوعا بالصنف "بوسلام" ثم الصنف "GTA". تدل النتائج أيضا أن تأثير العزلات الفطرية على طول النظام الهوائي يعتبر تأثيرا قويا ومعتبرا إذا ما قورنت بالنتائج بالشتلات غير الملقحة (جدول 10.I).



شكل 19.I. تأثير عزلات الـ *Fusarium* على طول النظام الهوائي (معدل التخفيض)*.

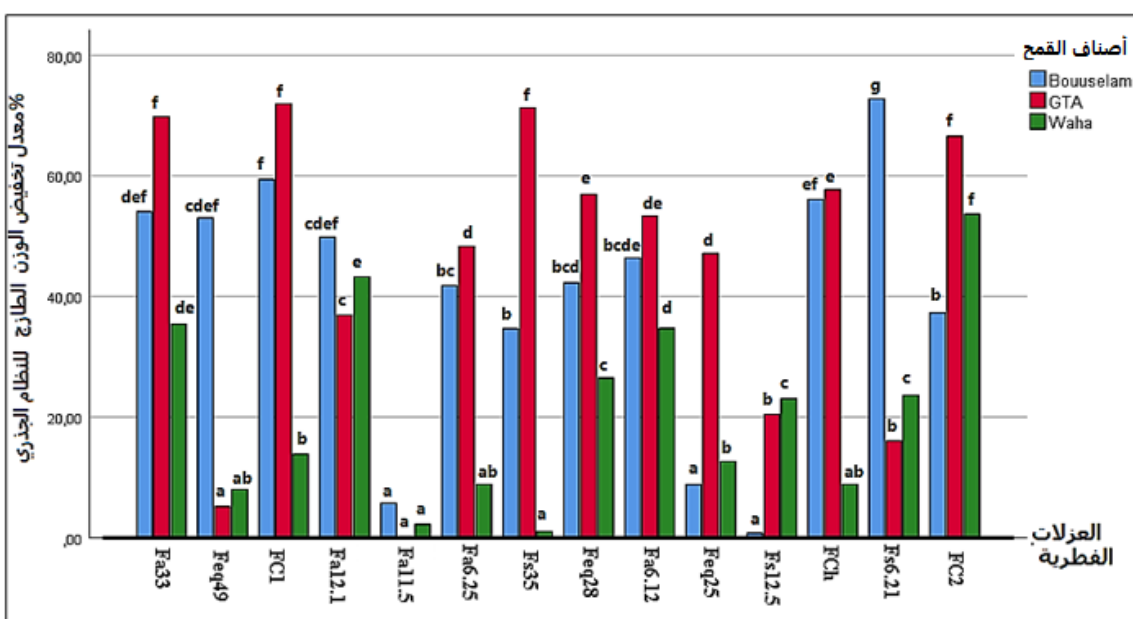
*القيم عبارة عن معدلات لثلاث تكرارات، كل تكرار عبارة عن معدل قياسات خمس شتلات. الأعمدة ذات اللون الواحد، المؤشرة بنفس الحرف (الأحرف) غير مختلفة معنويًا حسب اختبار Duncan في العتبة 5%.

جدول 10.I. تحليل التباين لتأثير عزلات الـ *Fusarium* على طول النظام الهوائي.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
Modèle corrigé	75276,384 ^a	44	1710,827	50,726	,000
Constante	98141,410	1	98141,410	2909,893	,000
Variety	4141,507	2	2070,754	61,398	,000
Isolate	37965,084	14	2711,792	80,405	,000
Variety * Isolate	33169,793	28	1184,635	35,124	,000
Erreur	3035,413	90	33,727		
Total	176453,208	135			
Total corrigé	78311,797	134			

بالنسبة لمعدل تخفيض الوزن الطازج للنظام الجذري "FWRS"، وجد أن العزلة الأكثر عدوانية مع الصنف "بوسلام"، هي دائما العزلة Fs6.21 بمعدل قدر بـ 72.72% وأن العزلات الأقل عدوانية هي Feq25، Fa11.5 وFs12.5 (نفس المجموعة الإحصائية) بمعدل قدر بـ 0.76%، 5.76% و8.79%. أما باقي العزلات فقد كانت المعدلات محصورة بين 34.7% و59.4%. أما مع الصنف "GTA"، فقد كانت العزلات FC2،

بينما كانت العزلتين Fa11.5 و Feq49 هما الأقل عدوانية بمعدل 0.23% و 5.17% على الترتيب، أما باقي العزلات فقد كانت المعدلات محصورة بين 16% و 57.7%. مع الصنف "واحة"، تميزت العزلة FC2 بأكثر عدوانية قدرت بـ 53.68%. على العكس من ذلك، كانت العزلتين Fs35 و Fa11.5 هما الأقل عدوانية بمعدل 1.02% و 2.31% على الترتيب، أما باقي العزلات فقد كانت المعدلات محصورة بين 8.03% و 43.25% (شكل 20.I).



شكل 20.I. تأثير عزلات الـ *Fusarium* على الوزن الطازج للنظام الجذري (معدل التخفيض)*.

*القيم عبارة عن معدلات لثلاث تكرارات، كل تكرار عبارة عن معدل قياسات خمس شتلات. الأعمدة ذات اللون الواحد، المؤشرة بنفس الحرف (الأحرف) غير مختلفة معنويًا حسب اختبار Duncan في العتبة 5%.

من الناحية الاحصائية، أفضت دراسة التباين الى وجود اختلاف معنوي بشكل كبير جدا ($P < 0.001$) بين كل من: أصناف القمح فيما بينها، العزلات فيما بينها وبين العزلات والشواهد غير الملقحة (Tukey)، ماعدا العزلة Fa11.5 حيث كان الاختلاف بينها وبين الشواهد غير معنوي ($P > 0.05$). تدل هذه النتائج، من جهة، على أن العدوانية على الوزن الطازج للنظام الجذري تختلف بشكل كبير من عزلة الى أخرى، ومن جهة أخرى، تدل على أن صنف القمح يؤثر في العدوانية حيث لوحظ أن الصنف "GTA" كان الأكثر حساسية متبوعا بالصنف

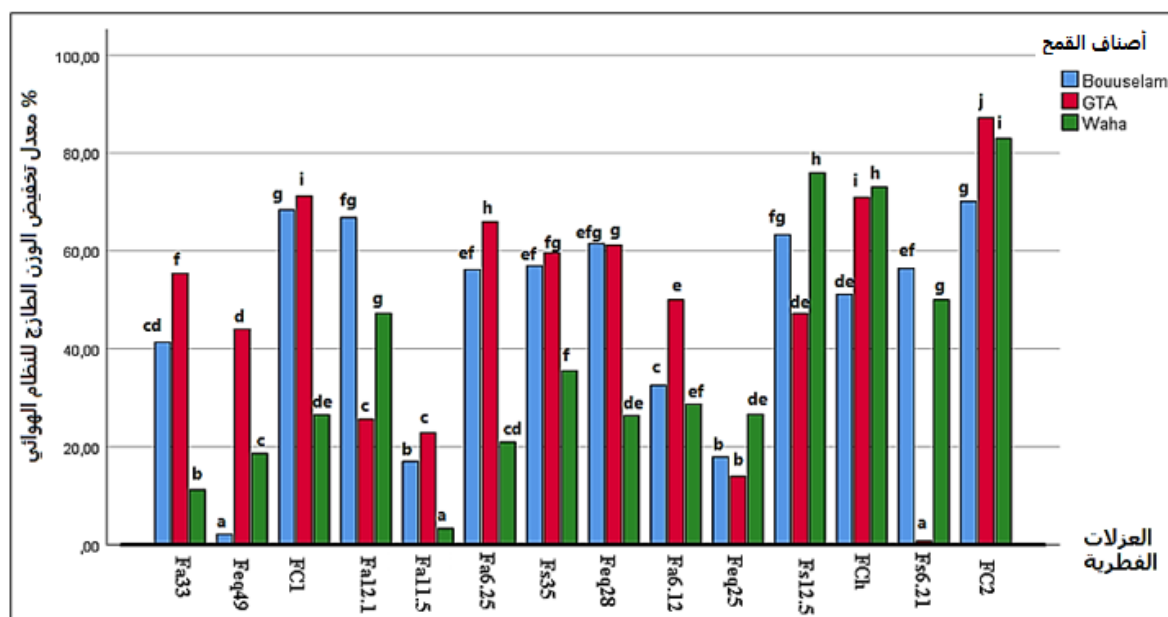
"بوسلام" ثم الصنف "واحة". تدل النتائج أيضا أن تأثير العزلات الفطرية على الوزن الطازج للنظام الجذري يعتبر تأثيرا قويا ومعتبرا إذا ما قورنت النتائج بالشتلات غير الملقحة (جدول 11.I).

جدول 11.I. تحليل التباين لتأثير عزلات الـ *Fusarium* على الوزن الطازج للنظام الجذري.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
Modèle corrigé	75107,301 ^a	44	1706,984	70,434	,000
Constante	146089,820	1	146089,820	6027,980	,000
Variety	12074,174	2	6037,087	249,103	,000
Isolate	35949,142	14	2567,796	105,953	,000
Variety * Isolate	27083,984	28	967,285	39,912	,000
Erreur	2181,176	90	24,235		
Total	223378,297	135			
Total corrigé	77288,476	134			

بالنسبة لمعدل تخفيض الوزن الطازج للنظام الهوائي "FWVS"، وجد أن العزلتان الأكثر عدوانية مع الصنف "بوسلام"، هما العزلتين FC1 و FC2 بمعدل قدر بـ 70% و 68.4% وأن العزلة الأقل عدوانية هي Feq49 بمعدل قدر بـ 2.17%. أما باقي العزلات فقد كانت المعدلات محصورة بين 17% و 66.83%. أما مع الصنف "GTA"، فقد كانت العزلات FC2 هي الأكثر عدوانية بمعدل 81.18%، بينما كانت العزلتين Fs6.21 هي الأقل عدوانية بمعدل 0.7%، أما باقي العزلات فقد كانت المعدلات محصورة بين 14% و 71.24%. مع الصنف "واحة"، تميزت العزلة FC1 أيضا، بأكبر عدوانية قدرت بـ 82.96%. على العكس من ذلك، كانت العزلة Fa11.5 هي الأقل عدوانية بمعدل وصل الى 3.33%، أما باقي العزلات فقد كانت المعدلات محصورة بين 11.23% و 75.93% (شكل 21.I).

من الناحية الاحصائية، أفضت دراسة التباين الى وجود اختلاف معنوي بشكل كبير جدا ($P < 0.001$) بين كل من: أصناف القمح فيما بينها، العزلات فيما بينها وبين العزلات والشواهد غير الملقحة (Tukey). تدل هذه النتائج، من جهة، على أن العدوانية على الوزن الطازج للنظام الهوائي تختلف بشكل كبير من عزلة الى أخرى، ومن جهة أخرى، تدل على أن صنف القمح يؤثر في العدوانية حيث لوحظ أن الصنف "GTA" كان الأكثر حساسية متبوعا بالصنف "بوسلام" ثم الصنف "واحة". تدل النتائج أيضا أن تأثير العزلات الفطرية على الوزن الطازج للنظام الجذري يعتبر تأثيرا قويا ومعتبرا إذا ما قورنت النتائج بالشتلات غير الملقحة (جدول 12.I).



شكل 21.I. تأثير عزلات الـ *Fusarium* على الوزن الطازج للنظام الهوائي (معدل التخفيض*).

*القيم عبارة عن معدلات لثلاث تكرارات، كل تكرار عبارة عن معدل قياسات خمس شتلات. الأعمدة ذات اللون الواحد، المؤشرة بنفس الحرف (الأحرف) غير مختلفة معنويًا حسب اختبار Duncan في العتبة 5%.

من جهة أخرى، بينت دراسة الارتباط بين العناصر المدروسة، وجود ارتباط معنوي كبير بين نسبة تخفيض طول الجذور ونسبة تخفيض طول الساق، وهذا لأن أي تأثير سلبي على الجذور (نقطة انطلاق الماء والأملاح) سيؤثر حتماً على الجزء الهوائي. كما وجد أن هناك ارتباط معنوي كبير أيضاً بين طول الجذور ووزنها الطازج وبين طول الجزء الهوائي ووزنه الطازج أو العكس، وهذا أيضاً لأن الجذور أو السيقان القصيرة سيكون وزنها غالباً قليل والعكس. كما تدل النتائج أيضاً (جدول 13.I) على نوع القمح طول ووزن الجذور يتأثران بنوع القمح المستعمل، وأن طول الجذور من جهة، وطول النظام الهوائي ووزنه الرطب من جهة أخرى يتأثرون بنوع العزلة الفطرية المدروسة.

أظهرت الدراسة حول تأثير عزلات الـ *Fusarium* على الجزء القاعدي لشتلات القمح، من خلال طول ووزن النظامين الجذري والهوائي، وجود تنوع واختلاف في عدوانية مختلف العزلات المختبرة أيضاً. يوجد هذا الاختلاف حتى بين العزلات من النوع الواحد. كما أن سلوك العزلة الواحدة قد يختلف من حيث نوع الأضرار الناتجة عن وجوده، حيث وجد أن بعض العزلات تكون عدوانية على الجذور أكثر من الساق أو العكس. فيما يخص طول كل من النظام الجذري والهوائي، ظهر أن النوع *F. culmorum* (ممثلاً بالعزلة FC2) هو الأكثر عدوانية.

جدول 12.I. تحليل التباين لتأثير عزلات الـ *Fusarium* على الوزن الطازج للنظام الهوائي.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
Modèle corrigé	85294,600 ^a	44	1938,514	104,490	,000
Constante	231971,195	1	231971,195	12503,724	,000
Variety	2692,973	2	1346,486	72,578	,000
Isolate	56636,117	14	4045,437	218,057	,000
Variety * Isolate	25965,510	28	927,340	49,986	,000
Erreur	1669,695	90	18,552		
Total	318935,490	135			
Total corrigé	86964,295	134			

جدول 13.I. دراسة الارتباط (Pearson Correlation) بين العوامل المدروسة (معاملات الارتباط).

	Variety	Fungal isolate	RSL RED	VSL RED	FWRS RED	FWVS RED
Variety	1	.000	-0,372**	.158	-0,338**	-0,166
Fungal isolate	.000	1	.338**	.433**	.031	.353**
RSL_RED	-0,372**	.338**	1	.708**	.325**	.582**
VSL_RED	.158	.433**	.708**	1	.067	.567**
FWRS_RED	-0,338**	.031	.325**	.067	1	.475**
FWVS_RED	-0,166	.353**	.582**	.567**	.475**	1

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

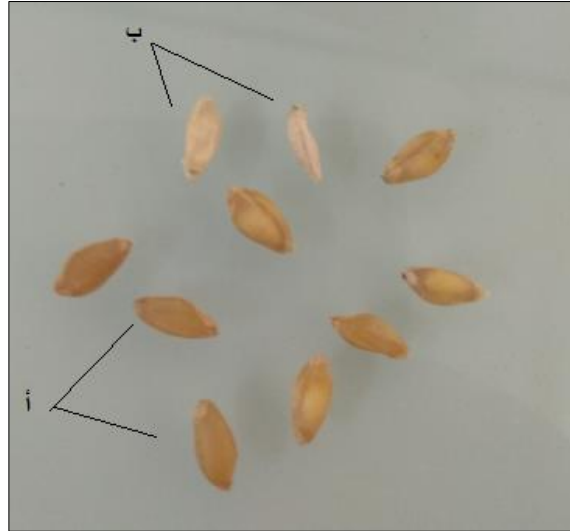
تعتبر هذه النتيجة موافقة ومقاربة للنتائج المتوصل اليها من طرف Mnasri وآخرون (2016) الذين وجدوا أن عزلات *F. culmorum* (عزلتين مختلفتين) يمكنها تقليص طول النظام الهوائي بمعدل 67.13% (العزلة الأولى)، وتقليص النظام الجذري بمعدل 52.7% (تعتبر هذه النتيجة أقل مما توصلنا اليه). تجدر الإشارة الى أن العزلة FCI، من نفس النوع، كانت عدوانيتها اقل بشكل ملحوظ من العزلة الأولى، لكن هذه النتيجة قريبة أيضا لما وصلت اليه Mnasri وآخرون (2016) عند استعمالهم لعزلة أخرى للـ *F. culmorum*، هذه الأخيرة قلصت طول النظام الهوائي والجذري بنسبة 28.97% و 16.22% على الترتيب (هذه القيم أقل من النتائج المتوصل اليها). ومنه يمكن الوصول الى أن عزلات *F. culmorum* يمكن أن تختلف فيما بينها، فمنها شديدة العدوانية ومنها متوسطة العدوانية. على العكس من ذلك، أظهرت النتائج أن كل من العزلتين Fa33 (من النوع *F. acuminatum*) و Feq25 (من النوع *F. equiseti*) كانتا الأقل عدوانية، على الرغم من وجود عزلات أخرى، من نفس النوع، كانت أكثر عدوانية (العزلتين Fa6.12 و Feq28). تعتبر هذه النتائج قريبة مما توصل

اليه Strausbaugh وآخرون (2005) حيث وجدوا أن تلقيح التربة بعزلات من النوع *F. acuminatum* يخفض من طول الجذور بنسبة بين 33% و 55%، ووجدوا أيضا أن تلقيح التربة بالنوع *F. equiseti* يخفض من طول الجذور بنسبة بين 21% و 56%، لكن هذه الأخيرة أكبر نسبيًا من القيم المتوصل إليها. فيما يخص الوزن الطازج لكل من النظامين الجذري والهوائي، وجد أيضا ان النوع *F. cumorum*، ممثلا بالعزلة FC2، هو الأكثر عدوانية، مع أن العزلة FC1 لم تكن بعيدة من حيث العدوانية. توافق هذه النتائج وتقارب ما توصلت إليها Mnasri وآخرون (2016)، حيث تحصلت من دراسة عدوانية عزلتين من النوع *F. cumorum* على تخفيض للوزن الطازج للنظام الجذري لنبات القمح، مساو لـ 65% مع العزلة الأولى، ومساو لـ 25.83% مع العزلة الثانية. كما تحصلت على تخفيض للوزن الطازج للنظام الهوائي مساو لـ 84.73% مع العزلة الأولى، ومساو لـ 57.37%. تعتبر عدوانية النوع *F. cumorum* ضد شتلات القمح (أي تأثيره على النظامين الجذري والهوائي) أمرا متفقا، عليه حيث توصلت الكثير من الدراسات الى أنه الأكثر فتكا ببذور وشتلات القمح، بالإضافة الى النوعين *F. pseudograminearum* و *F. graminearum* (Dehghanpour et al., 2019 ;) (Abdellah et al., 2019 ; Winter et al., 2019). توصلنا من خلال النتائج أن بعض عزلات *F. acuminatum* (العزلتين Fa6.12 و Fa6.25) و *F. solani* (العزلتين Fs12.5 و Fs6.21) و *F. equiseti* (العزلة Feq28)، أظهرت عدوانية ملحوظة على النظامين الجذري والهوائي. يؤكد هذه النتيجة ما توصل اليه Dehghanpour وآخرون (2019)، حيث توصلوا الى أن عزلات *F. acuminatum* و *F. solani* وكذلك *F. equiseti* يمكنها احداث امراضية لشتلات القمح بمعدلات بين 29.1% و 41.6%، بين 31.2% و 50% وبين 12.5% و 47.9% على الترتيب، وهذا من خلا تأثيرها على كل من طول ووزن كل من النظامين الجذري والهوائي. تبقى النتائج المتوصل اليها بخصوص عدوانية النوع *F. chlamydosporum* والتي اختلفت بين المتوسطة ضد طول النظامين الجذري والهوائي والقوية ضد الوزن الطازج للنظام الهوائي، فريدة من نوعها بسبب عدم وجود دراسات تقدر عدوانية هذا النوع تجاه العوامل المدروسة في هذا البحث، خاصة في نبات القمح.

3.5.3- اختبار القدرة الإراضية على عدد ووزن حبات القمح في السنابل

تم في هذا الاختبار تقدير القدرة الامراضية لبعض عزلات الـ *Fusarium*، وتم التعبير عن درجة العدوانية عن طريق حساب معدل عدد ووزن حبات القمح المتشكلة بعد جني السنابل، ثم مقارنتها مع الشواهد السلبية (غير الملتحة بالمعلقات الكونيدية).

تنوعت العدائية حسب صنف القمح، نوع العزلة، بل تنوعت حتى بين عزلات النوع الواحد (FC1 وFC2). أظهرت بعض العزلات عدوانية شديدة، بعضها الأخر عدوانية متوسطة أو ضعيفة. بصفة عامة، بدأ ظهور الأعراض بعد 20 يوم من عملية التلقيح، تمثلت الأعراض في ظهور تبيض (احتراق) السنيبلات بالمقارنة مع سنيبلات السنابل الشاهدة التي لازلت خضراء بالكامل (شكل I.23)، وقد اختلف عدد السنيبلات المحترقة حسب نوع القمح ونوع العزلة الفطرية، بين الاحتراق الجزئي والاحتراق الكلي للسنبلة (شكل I.23 ب). لوحظ في بعض الحالات تشكل بقع سوداء على السنيبلات المتضررة بشكل كبير، تنتقل هذه البقع تدريجيا الى السنيبلات المتضررة بشكل أقل، كما لوحظ أن السنابل المحترقة بالكامل تكون فارغة تماما (عدم تشكل الحبات) وكثيرا ما تكون مشوهة الشكل (شكل I.23 ج). بعد عملية الحصاد، تبين أن جميع العزلات الفطرية المختبرة أثرت على نضج حبات القمح، ولكن بشكل متفاوت من حيث عدد الحبات المتضررة في السنبلة، وحسب نوع القمح المختبر (شكل I.22).



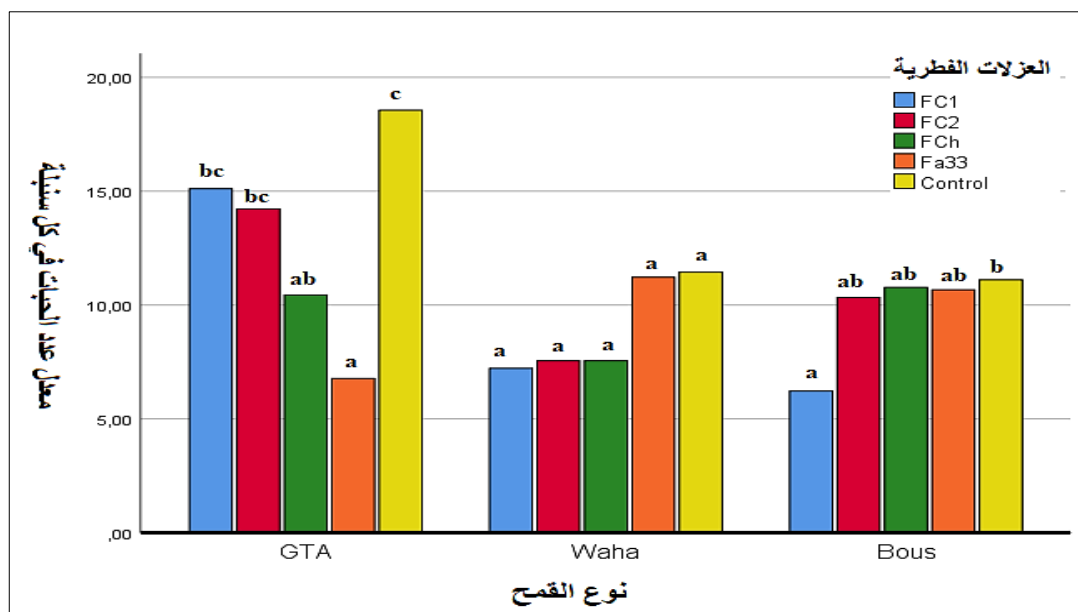
شكل I.22. تأثير عزلات الـ *Fusarium* على نضج حبات القمح. أ: حبات سليمة. ب: حبات مصابة (العزلة FC2).



شكل I.23. تأثير عزلات الـ *Fusarium* على تشكل سنابل القمح. ظهور الاحتراق الكلي أو الجزئي للسنابل (ب)، ظهور البقع السوداء وتشويه شكل السنبل (ج).

فيما يخص تأثير العزلات على معدل عدد الحبات في السنابل، مع الصنف "GTAdur"، خفضت العزلة Fa33 بشكل معنوي ($P < 0.05$) معدل عدد الحبات مقارنة مع الشواهد السلبية، فهي الأكثر عدوانية بمعدل عدد الحبات وصل 6.78 حبة/سنبل. أما العزلة FC1 فكانت هي الأقل عدوانية بمعدل عدد الحبات مساو لـ 15.11 حبة/سنبل. على العكس من ذلك، لم تكن العدوانية واضحة مع الصنف "واحة"، حيث ظهر أن العزلة Fa33 (التي كانت الأكثر عدوانية) أصبحت الأقل عدوانية بأعلى معدل عدد الحبات (بعد الشاهد) هو 11.22 حبة/سنبل. أعطت العزلة FC1 أقل معدل قدر بـ 7.22 حبة/سنبل دون وجود فرق معنوي بين العزلات المختبرة.

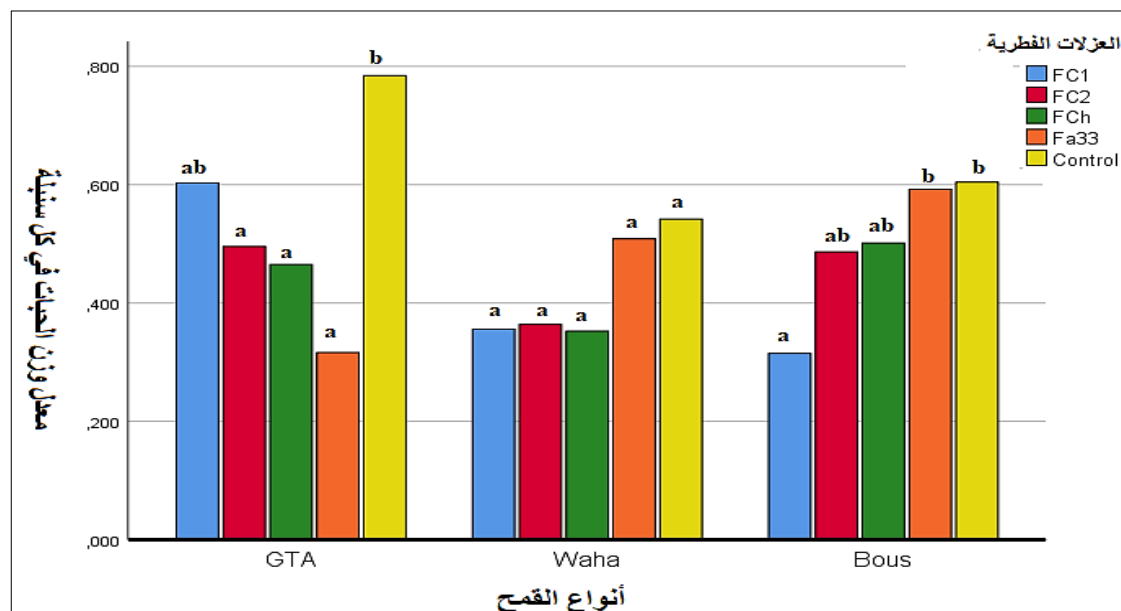
بالنسبة للصنف "بوسلام"، أظهرت العزلة FC1 عدوانية ملحوظة بتسجيل أصغر معدل لعدد الحبات قدر بـ 6.22 حبة/سنبله، بينما كانت العزلة FCh الأقل عدوانية بتسجيل أكبر معدل وهو 10.78 حبة/سنبله دون وجود فرق معنوي بينها وبين باقي العزلات (شكل 24.I).



شكل 24.I. تأثير عزلات الـ *Fusarium* على معدل عدد حبات القمح في السنبله. القيم المعطاة عبارة عن معدل (n=9). الأعمدة ذات اللون الواحد، المؤشرة بنفس الحرف (الأحرف) تعتبر غير مختلفة احصائيا حسب اختبار Duncan في العتبة 5%.

فيما يخص تأثير العزلات على معدل وزن الحبات في السنابل، خفضت العزلة Fa33 بشكل كبير معدل وزن الحبات مقارنة مع الشواهد السلبية، مع الصنف "GTAdur"، ظهر بذلك أنها الأكثر عدوانية بمعدل وصل 0.316 غ/سنبله. أما العزلة FC1 فكانت هي الأقل عدوانية بمعدل مساو لـ 0.603 غ/سنبله. على العكس من ذلك، لم تكن العدوانية واضحة مع الصنف "واحة"، حيث أظهرت الدراسة الإحصائية عدم وجود أي فرق معنوي بين العزلات الفطرية المختبرة. على الرغم من ذلك، أعطت العزلة FC1 أقل معدل قدر بـ 0.352 غ/سنبله، أما العزلة Fa33، التي كانت الأكثر عدوانية مع الصنف "GTAdur"، أصبحت الأقل عدوانية بأعلى معدل وزن الحبات (بعد الشاهد) وهو 0.509 غ/سنبله. بالنسبة للصنف "بوسلام"، أظهرت العزلة FC1 عدوانية ملحوظة بتسجيل أصغر معدل لعدد الحبات قدر بـ 0.315 غ/سنبله مع وجود فرق معنوي ($P < 0.05$) بينها

وبين باقي العزلات، بينما كانت العزلة FCh الأقل عدوانية بتسجيل أكبر معدل وهو 0.592 غ/سنبلة، مع وجود فرق معنوي بينها وبين باقي العزلات (شكل 25.I).



شكل 25.I. تأثير عزلات الـ *Fusarium* على معدل وزن حبات القمح في السنبلة. القيم المعطاة عبارة عن معدل (n=9). الأعمدة ذات اللون الواحد، المؤشرة بنفس الحرف (الأحرف) تعتبر غير مختلفة احصائيا حسب اختبار Duncan في العتبة 5%.

أظهر تحليل التباين لتأثير العزلات الفطرية على كل من عدد ووزن حبات القمح في السنبلة، من جهة، وجود اختلاف معنوي ($P < 0.05$) بين العزلات المختبرة فيما بينها، ومن جهة أخرى وجود اختلاف معنوي ($P < 0.05$) بين أصناف القمح المختبرة فيما يخص معدل عدد الحبات في السنبلة فقط. وهذا يدل على أن العزلات لم تكن عدوانية بنفس الشدة، كما تدل على أن حساسية أصناف القمح تجاه العزلات الفطرية تختلف أيضا حيث وجد أن الصنف "واحة" كان الأكثر حساسية متبوعا بالصنف "بوسلام" ثم الصنف "GTAdur". من جهة أخرى، وجد ان التفاعل بين العزلات الفطرية وأصناف القمح كان معنوياً، وهذا يدل على أن كليهما يؤثر على معدل عدد ووزن الحبات في السنبلة (جدول 14.I).

جدول 14.I. تحليل التباين لتأثير عزلات الـ *Fusarium* على معدل عدد ووزن حبات القمح في السنبلة.

Source	Variable dépendante	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
Modèle corrigé	Seeds_Num	1457,748 ^a	14	104,125	3,784	,000
	Seeds_Weight	2,161 ^b	14	,154	2,600	,003
Constante	Seeds_Num	15211,030	1	15211,030	552,756	,000
	Seeds_Weight	31,853	1	31,853	536,668	,000
Variety	Seeds_Num	406,415	2	203,207	7,384	,001
	Seeds_Weight	,278	2	,139	2,339	,101
Fungi	Seeds_Num	348,785	4	87,196	3,169	,016
	Seeds_Weight	,873	4	,218	3,677	,007
Variety * Fungi	Seeds_Num	702,548	8	87,819	3,191	,003
	Seeds_Weight	1,010	8	,126	2,128	,038
Erreur	Seeds_Num	3302,222	120	27,519		
	Seeds_Weight	7,122	120	,059		
Total	Seeds_Num	19971,000	135			
	Seeds_Weight	41,137	135			
Total corrigé	Seeds_Num	4759,970	134			
	Seeds_Weight	9,283	134			

صرحت الكثير من الدراسات، أن عزلات النوع *F. culmorum* تكون ذات أضرار كبيرة على امتلاء وتشكل السنابل، مسببة بذلك ما يعرف بمرض لفحة السنابل، وبهذا فقد عرف هذا النوع أنه من بين أكثر الأنواع ضررا على منتج القمح وجودته (Obanor and Chakraborty, 2014; Touati-Hattab et al., 2016; Bottalico and Perrone, 2002). من جهة أخرى، فقد توصل Chehri وآخرون (2011)، الى أن عزلات النوع *F. chlamydosporum* كانت من بين العزلات الأكثر عدائية تجاه سنابل القمح، كما توصلت Tan وآخرون (2012)، أن عزلات النوع *F. acuminatum* كانت ضمن ثلاث أكثر أنواع عدائية تجاه السنابل، مع إنتاج كميات قاتلة من السموم الفطرية. تؤكد هذه النتائج ما تم التوصل اليه، حول عدائية الأنواع المذكورة تجاه سنابل القمح.

تعتبر النتائج المتحصل عليها موافقة للنتائج المذكورة سابقا، حيث وجد أن جميع العزلات يمكنها تخفيض كل من معدل كل من عدد ووزن حبات القمح في السنبلة (مع عدم وجود فرق معنوي بين العزلات) على الرغم من تأثير العدائية بشكل واضح بنوع القمح المختبر.

يتمثل أهم سبب في كون العديد من الأنواع التابع لجنس الـ *Fusarium* ممرضة للنبات عامة و للقمح خاصة، إنتاجها للسموم الفطرية، حيث أثبتت العديد من الأبحاث، أن الأنواع التي تم التعرف عليها في هذا

البحث، تنتج أنواعا مختلفة من السموم الفطرية مثل deoxynivalenol و zearalenone بالنسبة لـ *F. cumorum* (Mastanjević *et al.*, 2019) ومثل Trichothecenes و zearalenone بالنسبة لـ *F. acuminatum* (Tan *et al.*, 2012) ومثل Chlamydosporol و neosolaniol monoacetate بالنسبة لـ *F. chlamydosporum* (Savard *et al.*, 1990)، مثل nivalenol بالنسبة لـ *F. equiseti* (Goswami *et al.*, 2008) ومثل Deoxynivalenol بالنسبة لـ *F. solani* (Richard *et al.*, 2007). تؤثر هذه السموم على شدة الإصابة على كل من غمد الريشة وعلى كل من طول ووزن النظامين الجذري و الهوائي، يمكن أن يعود هذا التأثير الى أن السموم عادة تثبط بناء البروتينات و الأنزيمات النباتية المسؤولة عن تحفيز الدفاع عند النبات المضيف (Khalifah and Matny, 2013)، أظهرت عدة دراسات أيضا أن زيادة كمية السموم الفطرية يزيد من امراضية الفطر، إما من خلال تأثيره على تخليق البروتين داخل خلايا النبات أو من خلال تحفيز النبات لإنتاج بيروكسيد الهيدروجين الذي يحفز موت الخلية المبرمج (Burlakoti *et al.* 2007; Aleandri *et al.* 2007; Desmond *et al.* 2008).

4- خاتمة

تم في هذا الفصل عزل وتشخيص 14 عزلة فطرية تنتمي الى 5 أنواع مختلفة من جنس الـ *Fusarium*، انطلاقا من 59 عينة من حبوب القمح تم الحصول عليها من عدة ولايات من الشمال الشرقي للجزائر. تم تحديد الأنواع عن طريق التعريف المظهري (دراسة المستعمرات إضافة الى الدراسة المجهرية) لجميع العزلات، كما تم اللجوء الى التعريف الجزيئي من أجل تأكيد النتائج لبعض العزلات. تطلب التعريف الجزيئي دراسة تسلسل rDNA الناتج عن استعمال نوع واحد فقط من البادئات (EF-1)، بينما تطلب التعريف بالنسبة لعزلات أخرى، استعمال نوعين من البادئات (ITS-1 ; EF-1). تمثلت الأنواع الفطرية المتحصل عليها في *F. acuminatum* (5 عزلات)، *F. solani* (3 عزلات)، *F. equiseti* (3 عزلات)، *F. culmorum* (عزلتين) و *F. chlamydosporum* (عزلة واحدة). من خلال نتائج التعريف، تم التصريح لأول مرة عن وجود هذه الأنواع (ماعدا النوعين *F. acuminatum* و *F. culmorum*) في بذور القمح الصلب في الجزائر.

تبين من خلال دراسة تأثير درجة الحرارة ونوع وسط الزرع، على نمو العزل الفطري وعلى إنتاج الأبواغ أن غالبية العزلات الفطرية المدروسة تميل الى النمو الجيد في درجات الحرارة المعتدلة (بين 25م° و 28م°)، كما تبين أن وسط الزرع يؤثر بشكل واضح على عملية النمو وعلى عملية إنتاج الأبواغ، حيث يسمح الوسط الغني بالمغذيات (PSA) بنمو كبير وكثيف للميسيليوم إلا أنه بالمقابل لا يحفز عملية إنتاج الأبواغ. على العكس من ذلك، يحفز الوسط الفقير من المغذيات (SNA) النمو السريع والضعيف (قليل الكثافة) للميسيليوم، كما يحفز الإنتاج الكثيف للأبواغ، وعليه فقد خلصنا الى أن الوسط PSA يستعمل في الدراسة المظهرية للمستعمرات، أما الوسط SNA فيستعمل في الدراسة المجهرية للأبواغ (الشكل والترتيب).

تبين من خلال دراسة الأمراض التي يمكنها إحداث أضرار لبذور وشتلات القمح، لكن بدرجات متفاوتة، حيث تبين من خلال جمع المعلومات الناتجة عن اختبار التأثير على عملية الإنبات وعلى طول غمد الريشة أن النوعين *F. chlamydosporum* و *F. culmorum* هما الأكثر عدوانية بمعدلات فاقت 60% بالنسبة لتنشيط الإنبات، وبمعدلات فاقت 80% بالنسبة لتخفيض طول غمد الريشة. كما تبين من خلال جمع المعلومات الناتجة عن اختبار التأثير على الطول والوزن الطازج لكل من النظامين الجذري والهوائي أن النوعين *F. solani* و *F. culmorum* (ممثلا بالعزلتين Fs12.5 و Fs6.21) هما الأكثر عدوانية بمعدلات بين 50% و 80% حسب نوع الاختبار والنوع الفطري، أظهر النوع *F. chlamydosporum* عدوانية أيضا، لكنها أقل من النوعين السابقين (بين 31% و 65% حسب نوع الاختبار). توصلنا من خلال هذه الدراسة أيضا، أن صنف القمح يلعب دورا مهما في مدى عدوانية العزلات، حيث بدت بعض الأنواع أكثر حساسية من أخرى.

المحور الثاني

دراسة الضدية لبكتيريا المنطقة الجذرية على العزلات الممرضة لـ *Fusarium*

1- مقدمة

يمثل مرض تعفن الجذور (FCR) مشكلا حقيقيا إذ يسبب خسائر فادحة في كل من المردود (انكماش الحبوب وخفة وزنها) وجودة حبوب القمح (بسبب السموم الفطرية) في مناطق عدة من العالم (Scherm *et al.*, 2015; Balmas *et al.*, 2013). عدة أنواع من الـ *Fusarium* يمكنها احداث هذا المرض، الأكثر أهمية هي: *Fusarium culmorum* إضافة الى النوعين *Fusarium pseudograminearum* و *Fusarium graminearum*. يتم مكافحة هذه الأمراض غالبا باستعمال المبيدات الفطرية الكيميائية. ومع ذلك، فان تطور المقاومة الفطرية ضد هذه المبيدات في الكثير من الحالات، أو عدم وجود مبيدات فطرية فعالة ضد العامل الفطري المستهدف، بالإضافة إلى الآثار الضارة على البيئة هي المحددات الرئيسية لهذه الطريقة (Jiménez-Gasco *et al.*, 2004). وعليه، فان إيجاد واستعمال طرق تحكم (سيطرة) بديلة يعتبر أمرا بالغ الأهمية من أجل الحد من انتشار ممرضات المحاصيل.

أصبحت البدائل ذات المستوى العالي من الأمان والأكثر صداقة للبيئة مثل استخدام الميكروبات، ذات القدرة الضدية (فطريات أو بكتيريا)، للسيطرة على مسببات الأمراض النباتية تحظى باهتمام متزايد (Eljounaidi *et al.*, 2016). أثبتت بكتيريا المحيط الجذري ممثلة خاصة بالجنسين *Bacillus* و *Pseudomonas* فعاليتها كعوامل تحكم حيوية (في الدفيئات أو في ظروف الحقل) ضد الفطريات الممرضة ترابية المنشأ (soil-borne) التي تسبب أمراضا للجذور عند محاصيل نباتية مختلفة (Agarwal *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2018; Santoyo *et al.*, 2012). ذكرت عدة دراسات سابقة، تم مراجعتها من طرف Scherm وآخرون (2013)، أن معالجة البذور بالبكتيريا (خصوصا أنواع *Bacillus* و *pseudomonas* المفطورة) هي تقنية واعدة للتحكم الحيوي في الفطريات الممرضة للقمح.

تمتلك هذه البكتيريا عدة آليات، للحد من، أو القضاء على الممرضات النباتية مثل: المنافسة على الحديد (بإنتاج حاملات الحديد)، إنتاج المضادات الحيوية وأنزيمات هدم الجدار (Wall degrading enzymes)، تحفيز النمو النباتي (PGP) وتحفيز آليات الدفاع النباتي (Eljounaidi *et al.*, 2016).

سيتم في هذا الفصل دراسة القدرة الضدية لعدة سلالات بكتيرية من الجنس *Bacillus* و *pseudomonas* ضد عزلات الـ *Fusarium* الأكثر عدائية تجاه بذور وشتلات القمح.

2- الوسائل والطرق

1.2- المادة النباتية

تم استعمال بذور قمح غير معالجة كيميائياً، من الصنف "بوسلام" باعتباره الصنف الأكثر حساسية غالباً في اختبارات الأمراض، تم حفظها على درجة حرارة الغرفة (بين $22 \pm 3^\circ\text{C}$). تم الحصول على عينات بذور القمح الصلب من المركز الوطني لمراقبة البذور والشتائل وتصديقها (CNCC Centre National de Contrôle) (et de Certification des semences et plants) لولاية سطيف، الجزائر.

2.2- المادة البكتيرية

تم الحصول على السلالات البكتيرية انطلاقاً من التربة اللصيقة بالجذور (Rhizospheric soil) لنباتي القمح أو الشعير، من 37 منطقة مختلفة، من أربع ولايات من الشمال الشرقي الجزائري وهي: ميلة (6 مناطق)، سطيف (14 مناطق)، باتنة (10 مناطق) وبرج بو عريريج (7 مناطق).

تم إزالة التربة من الجذور بلطف، ثم وضعت في أكياس بلاستيكية، التي تم نقلها مباشرة إلى المخبر عن طريق حاوية مبردة، وأخيراً حفظت العينات في الثلجة (5°C) حتى استعمالها في وقت لاحق.

من أجل عزل البكتيريا، يتم رج الجذور، يدوياً، بعنف، من أجل إزالة التربة الزائدة نهائياً. يتم مزج 1 غ من التربة اللصيقة جذاً بالجذور مع 9 مل من الماء المقطر المعقم، يرج المجموع مدة 60 ثا. من أجل الأنواع المفلورة من *Pseudomonas*، يتم إجراء تخفيف عشري للمزيج حتى التخفيف الخامس. انطلاقاً من التخفيف الثالث الأخيرة يتم توزيع 0.1 مل على الوسط KB (King B). أما بالنسبة لأنواع *Bacillus*، فيتم حضان المزيج (الأنابيب المحتوية على التربة والماء) على درجة حرارة 80°C لمدة 30 د (من أجل القضاء على جميع الأشكال الخضرية)، ثم يتم إجراء تخفيف عشري للمزيج حتى التخفيف الخامس. انطلاقاً من التخفيف الثالث الأخيرة يتم توزيع 0.1 مل على الجيلوز المغذي " NA " (Nutrient Agar). بعد الحضان لمدة يومين على درجة حرارة 28°C ، يتم عزل وتنقية المستعمرات التي تبدي فلورة خضراء تحت الأشعة UV (366nm) (باستعمال الجهاز DESAGA Heidelberg) على الوسط KB على أنها *Pseudomonas fluorescent spp*. بالمقابل، يتم عزل

وتتقنية بعض المستعمرات النامية على الوسط NA (واحدة عن كل مجموعة من المستعمرات المتشابهة) على نفس الوسط على أنها *Bacillus spp*.

3.2- المادة الفطرية

من أجل تقدير ضدية البكتيريا المعزولة ضد الفطريات الممرضة لنبات القمح، تم استعمال ثلاث عزلات فطرية، تم اختيارها على أساس اختبار القدرة الإراضية للعزلات المتحصل عليها في المحور السابق وهي: *F.culmorum 1* (FC1)، *F.culmorum 2* (FC2)، *F.chlamydosporum* (FCh). من أجل الحصول على الكونيديات، تنمى العزلات على الوسط SNA في درجة حرارة 28°م لمدة 15 يوم في الظلام. يتم تحضير المعلق الكونيدي (Conidial suspensions) بإضافة 10 مل من الماء المقطر المعقم الى المستعمرة، ثم يتم كشطها يدويا من أجل: فصل الكونيديات عن الميسيليوم من جهة، وفصلها عن بعضها ان كانت متجمعة في الـ *Sporodochia* من جهة أخرى. يتم تحديد التركيز عادة عند 10⁵ كونيديا/مل. يتم حفظ الفطريات، بين الاستعمال والآخر، في أوساط PSA مائلة، تحت درجة حرارة 5°م.

4.2- دراسة ضدية البكتيريا الجذرية تجاه عزلات الـ *Fusarium*

تم تقدير فعالية جميع السلالات البكتيرية، ضد نمو الميسيليوم للفطريات الثلاث المذكورة سابقا، باستعمال تقنية الزرع المزدوج (Dual culture) المقترحة من طرف (Gupta et al., 2001). يتم وضع قرص بقطر 6 مم مأخوذ من مستعمرة الفطر المدروس، عمرها 7 أيام، في مركز الأطباق المحتوية على الوسط PDA (Liofichem). يتم زرع البكتيريا على شكل خطين متوازيين، يبعد كل منهما عن مركز المستعمرة بـ 2.5 سم، انطلاقا من مزارع بكتيرية عمرها 48 ساعة، لكل السلالات البكتيرية المختبرة (شكل I.II). بالنسبة للشواهد، يوضع قرص الفطر وحده (دون البكتيريا) في مركز أطباق الزرع. تحضن جميع الأطباق على درجة حرارة 28°م لمدة 5 أيام، ثم تحسب نسب تثبيط النمو الشعاعي للفطر المختبر. تم تكرار جميع الاختبارات 3 مرات. من أجل دراسة تأثير وسط الزرع، تم إعادة جميع التجارب السابقة على وسط زرع آخر وهو الوسط NA. تم حساب معدلات تثبيط الفطريات بالمقارنة مع الشواهد باستعمال معادلة Vincent (1947):

$$I = \frac{(C-T) \times 100}{C}$$

حيث: I = نسبة تثبيط النمو الشعاعي للميسيليوم.

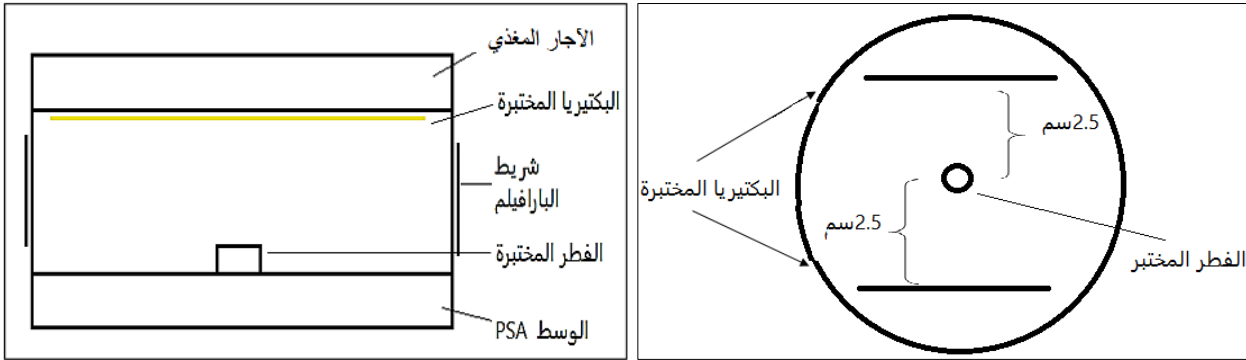
C = النمو الشعاعي للميسيليوم الشاهد.

T = النمو الشعاعي للميسيليوم الفطري في وجود البكتيريا.

من بين السلالات التي أظهرت فعالية في تخفيض النمو الشعاعي للفطريات الممرضة، تم اختيار أفضل السلالات البكتيرية من أجل اختبار الفعالية ضد انبات الكونيديات ومن أجل اختبار المكافحة الحيوية في كل من المخبر " *in vitro* " والدفينة.

5.2- دراسة نشاطية المركبات الطيارة البكتيرية تجاه عزلات الـ *Fusarium*

تم دراسة نشاطية المركبات الطيارة البكتيرية لـ 16 سلالة بكتيرية فقط، وهي التي أعطت نسب تثبيط للنمو الشعاعي أكبر من 50% بالنسبة لأنواع *Bacillus* وأكبر من 30% بالنسبة لأنواع *Pseudomonas* باستعمال طريقة الأطباق المزدوجة المغلقة المقترحة من طرف Fiddman و Rossal (1993). انطلاقاً من مزرعة بكتيرية في المرق المغذي (Nutrient Broth) "NB" ذات 24 ساعة، توزع 10 µl على سطح الوسط NA في طبق بتري. يلقح طبق آخر يحتوي على الوسط PSA بقرص فطري قطره 6 مم مأخوذ من مستعمرة ذات 7 أيام، في مركز الطبق. يوضع الطبق الثاني مقلوبا على الطبق الأول (وجه قاعدة الطبق الأول مقابلة لوجه قاعدة الطبق الثاني). يغلق الطبقان مع بعضهما البعض بإحكام باستعمال شريط البارافيلم، للتأكد من أن كلا الكائنين في نفس الجو على الرغم من أنهما منفصلين (شكل 1.II).



شكل 1.II. رسم تخطيطي يبين طريقة اختبار الضدية البكتيرية تجاه عزلات الـ *Fusarium*. الى اليمين: باستعمال تقنية الزرع المزدوج. الى اليسار: اختبار نشاطية المركبات الطيارة.

بالنسبة للشواهد، يوضع طبق تحتوي على الوسط NA فقط (دون البكتيريا) مقابلة لطبق ثان يحتوي على الوسط PSA الملقح بقرص فطري قطره 6 مم. تكرر جميع التجارب 3 مرات. تحضن جميع الأطباق على درجة حرارة 28 م° لمدة 5 أيام، ثم تحسب نسب تثبيط النمو الفطري بالمقارنة مع الشواهد، باستعمال المعادلة المقدمة من طرف Vincent (1947)، المذكورة سابقاً.

6.2- تأثير البكتيريا الجذرية على انبات كونيديات الـ *Fusarium*

تم تقييم السلالات البكتيرية المختارة، من حيث تأثيرها المثبط على انبات الكونيديات الكبيرة والصغيرة، للعزلات الفطرية الثلاث السابقة الذكر (FC1، FC2، FCh). أجريت الدراسة المخبرية "in vitro" باستعمال أطباق الآبار الدقيقة (Micro-well plate) اقتباساً عن الطريقة المطبقة من طرف Mnasri وآخرين (2016). يوضع 75µl من البكتيرية المختبرة حديثة النمو، (بتركيز 10⁸ خلية/مل) في أحد آبار السطر الأول للطبق. مباشرة، يضاف الى نفس البئر 75µl أخرى من المعلق الكونيدي للتعزلة الفطرية المختبرة بتركيز 10⁵ كونيديا/مل. بالنسبة للشواهد، يتم مزج 75µl من المرق المغذي مع 75µl من المعلق الكونيدي. تم تكرار كل مزيج ثلاث مرات (شكل II.2). في الأخير، يتم حضن الأطباق على درجة حرارة 28 م° مدة 24 ساعة، ثم تؤخذ عينات (عينة من كل بئر) عن طريق ابرة الزرع للمشاهدة تحت المجهر. تم تقييم إنبات الكونيديات والتشوهات الحاصلة، خاصة في الكونيديات الكبيرة، في ست مكررات (ثلاث آبار لكل مزيج ومنطقتين لكل شريحة). تم حساب النسب المئوية لتنشيط انبات الكونيديات الفطرية باستخدام السلالات البكتيرية، مقارنة بالشواهد باستخدام الصيغة التالية:

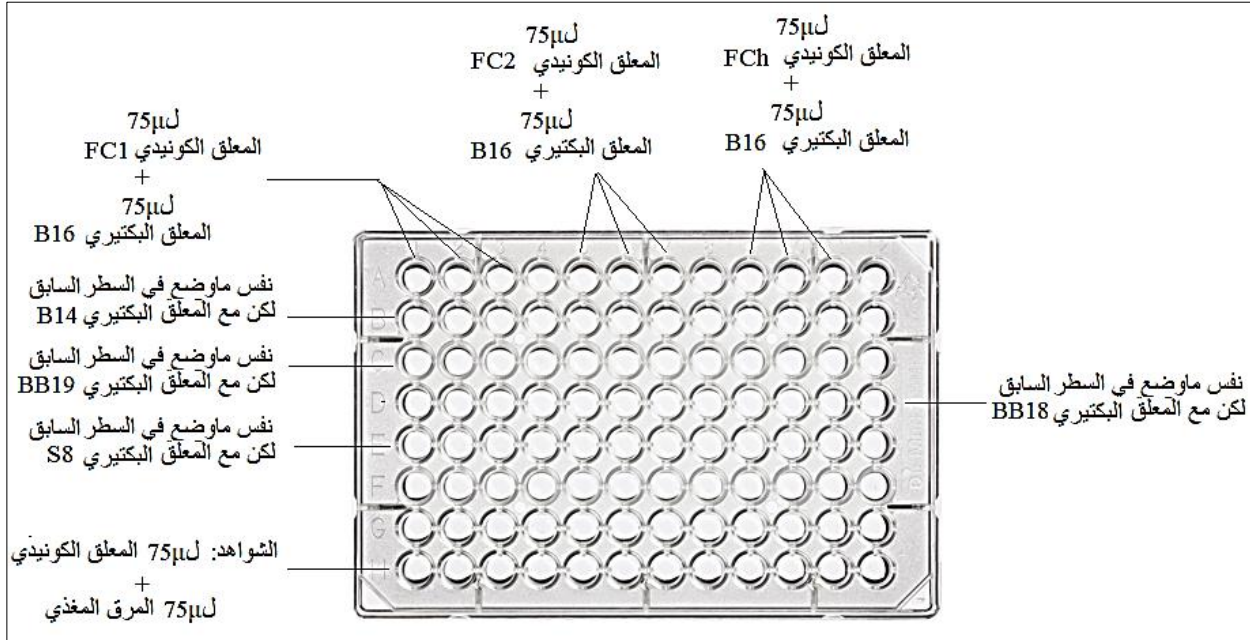
$$\text{Inh\%} = ((\sum \text{GSC} - \sum \text{GST}) / \sum \text{GSC}) \times 100.$$

حيث **GSC**: عدد الكونيديات المتبرعمة بالنسبة للشواهد. **GST**: عدد الكونيديات المتبرعمة في وجود البكتيريا.

7.2- دراسة المكافحة الحيوية في المخبر "In vitro"

تم تقييم السلالات البكتيرية المختارة، من حيث تأثيرها على نمو غمد الريشة والجذور في وجود عزلاتي *F. culmorum* على بذور القمح. نظراً لأن *F. culmorum* معروف بسلوكه العدائي الكبير تجاه بذور وشتلات القمح مقارنة بباقي الأنواع، فقد ركزت هذه الدراسة على هذا النوع فقط. تمت هذه الدراسة وفق الطريقة المقترحة من طرف (Djébali, 2012)، حيث تم نقع البذور من الصنف "بوسلام" في 5 مل من المزرعة البكتيرية المدروسة، عمرها 24 ساعة وبتركيز 10⁸ خلية/مل، لمدة ساعتين ونصف، ثم تضاف كمية من النشا إلى المزيج للحصول على خليط لزج، لتسهيل ارتباط البكتيريا بالبذور، تحرك البذور جيداً في المزيج، يدويًا، ثم تترك فيه لمدة ساعة واحدة، أي تبقى البذور مع البكتيريا 3 ساعات ونصف. فيما يخص الشواهد، تنقع البذور في المرق المغذي لمدة ساعتين ونصف، ثم في المزيج مع النشا لساعة أخرى.

بعد عملية النقع، توضع 15 حبة قمح في ثلاث أطباق بتري، 5 حبات في كل طبق، بين ورقتي ترشيح، ثم يضاف عليها 5 مل من الوسط PSB.



شكل 2. II. دراسة تأثير السلالات البكتيرية على انبات الكونيديات الفطرية بطريقة Micro-well plate.

بالنسبة لاختبار الوقاية، تنقع البذور في المعلق البكتيري لمدة ساعتين ونصف، ثم في مزيج من النشا والبكتيريا لمدة 1 سا. بعد ذلك، توضع البذور في طبق بتري بين ورقتي ترشيح بمعدل 5 حبات في كل طبق، ويضاف عليها 5 مل من الميسيليوم المخفف، الذي يتم تحضيره بوضع 5 أقراص قطرها 6 مم مأخوذة من مستعمرة الفطر المدروس، عمرها 7 أيام، في قارورة تحتوي على 75 مل من الوسط PSB، ترج القارورة، على جهاز الرج (GLF 3006)، لأربعة أيام ثم يضاف إليها نفس الحجم من نفس الوسط. في الأخير، تحضن جميع الأطباق على درجة حرارة 28 م°، في الظلام (Essemine et al., 2007).

بعد أربعة أيام، يتم قياس كل من: طول غمد الريشة، طول الجذر الأطول وعدد الفروع الجذرية لـ 15 بذرة متبرعمة. انطلاقاً من القياسات المتحصل عليها، يتم حساب نسبة تخفيض طول كل من غمد الريشة والجذر الأطول وعدد التفروعات الجذرية، باستعمال المعادلة المقترحة من طرف (Sivan et al., 1947).

$$I = \frac{(C-T) \times 100}{C}$$

I = نسبة التخفيض.

C = طول غمد الريشة أو الجذر الطول أو عدد التفروعات في البذور الشاهدة.

T = طول غمد الريشة أو الجذر الطول أو عدد التفروعات في البذور المعالجة.

أما بالنسبة لنسبة الوقاية (Prevention)، فيتم حسابها باستعمال معادلة (Song *et al.*, 2004) المبينة أدناه.

$$\text{نسبة تخفيض المرض (الوقاية) (\%)} = \frac{\text{نسبة حدوث المرض (الشاهد)} - \text{نسبة حدوث المرض (المعالج)}}{\text{نسبة حدوث المرض (الشاهد)}}$$

8.2- دراسة المكافحة الحيوية في الدفيئة "in planta"

تم تقييم تأثير السلالات البكتيرية، المختارة سابقاً، على الأضرار الحاصلة في الجزء القاعدي للقمح، في وجود نفس العزلات السابقة من الـ *Fusarium* (FC1 وFC2) وفقاً للطريقة المقترحة من طرف Demirci وDane (2003) مع بعض التعديلات الطفيفة. تم تنمية شتلات القمح من الصنف "بوسلام" في إصيص (Pots) بقطر 8 سم وعمق 12 سم، تحتوي على تربة معقمة، وضع في كل وعاء ثلاثة بذور، تم تعقيمها سطحياً ثم غمرت في المعلق بكتيري لمدة ساعتين ونصف، ثم في خليط النشاء والبكتيريا لمدة ساعة واحدة. بعد ذلك، يتم وضع قرص واحد بقطر 6 مم من مزرعة عزلة الـ *Fusarium*، عمرها 7 أيام على اتصال مباشر مع كل بذرة. تغطي البذور واللقاح الفطري بعناية بطبقة من التربة المعقمة سمكها 2 سم تقريباً. في حالة الشواهد الموجبة، يوضع قرص من مزرعة الفطر بقطر 6 مم في اتصال مع البذور المعقمة، أما في حالة الشواهد السالبة، فيتم وضع البذور المعقمة وحدها دون بكتيريا أو فطر. تجدر الإشارة أن كل تركيبة تم تكرارها ثلاث مرات. في الأخير، تم وضع جميع الأواني المزروعة في الدفيئة، بتوزيع عشوائي كلي (Completely randomized design)، يعرف هذا التوزيع بـ "The split-plot design". تسقى الشتلات يومياً بماء الحنفية، لمدة 20 يوم، أما في العشر أيام الأخيرة من التجربة، تغير طريقة السقي إلى "يوم سقي/يوميون دون سقي" من أجل دعم الإصابة الفطرية للنباتات، وفق ما تم وصفه من طرف Gargouri-Kammoun وآخرين (2009). بعد 30 يوم، يتم اقتلاع الشتلات من التربة بعناية. يتم قياس الطول والوزن الطازج لكل من النظامين الجذري والهوائي. انطلاقاً من القياسات، يتم حساب نسبة التخفيض لكل من الطول والوزن الطازج لكل من النظامين الجذري والهوائي باستعمال المعادلة المقترحة من طرف (Sivan *et al.*, 1947) المذكورة سابقاً.

9.2- توضيح آلية العدائية البكتيرية للممرضات الفطرية

لتوضيح الآلية الكامنة وراء سلوكها العدائي، تم إخضاع السلالات البكتيرية التي أظهرت أنشطة معادية ضد عزلات فطر الـ *Fusarium* للاختبارات التالية:

1.9.2- إنتاج سيانيد الهيدروجين (HCN)

تم إجراء هذا الاختبار حسب ما وصفه Bakker و Shippers (1987). تم تلقیح أطباق تحتوي على الوسط TSA (Trypticase Soy Agar) مضاف إليها الجلوسين بمعدل 4.4 غ/ل، بواسطة مزارع بكتيرية حديثة. يتم غمس أقراص أوراق الترشيح (Whatman No.1) في محلول حمض البيكريك ووضعها داخل غطاء الطبق. وأخيراً، يتم إغلاق الأطباق جيداً باستعمال شريط البارافيلم، ثم تحضن لمدة 5 أيام عند 30 م°، مع مراعاة استعمال ثلاث أطباق لكل سلالة بكتيرية. يتم ملاحظة تغير لون ورق الترشيح، تعتبر البكتيريا منتجة لغاز HCN إذا تغير لون ورق الترشيح من اللون الأصفر إلى اللون البني، ويتم تقدير درجة انتاجه بظهور اللون البني الفاتح الذي يزيد عتامة بزيادة الإنتاج.

2.9.2- إنتاج أنزيمات هدم الجدار الخلوي الفطري

1.2.9.2- إنتاج الأميلاز

تم دراسة إنتاج أنزيم الأميلاز من طرف السلالات البكتيرية على الوسط الصلب YMA، مع استبدال المانيتول بالنشا (ملحق 1). من أجل ذلك، تلقح الأطباق بحجم 10 µل من مزارع بكتيرية حديثة على شكل بقعة (ثلاث أطباق لكل سلالة).

بعد الحضن لمدة 72 ساعة على درجة حرارة 28 م°، تتم عملية الكشف بإضافة 3 مل من محلول الأيودين لكل طبق. تظهر النشاطية الأنزيمية في شكل هالات غير ملونة بالأزرق حول المستعمرة البكتيرية المنتجة للأنزيم (Oliveira et al., 2010)، تقاس أقطار النشاطية بطرح قطر المستعمرة من القطر الكلي للهالة.

2.2.9.2- إنتاج البروتياز (Protease)

تمت دراسة النشاط التحليلي للبروتين وفقاً لطريقة Kumar وآخرون (2012) باستخدام أجار الحليب المقشود "منزوع الدسم كلياً"، تمزج 10% من الحليب مع الوسط NA الذائب. تم تلقیح البكتيريا الحديثة على شكل بقع على ثلاثة أطباق. تحضن الأطباق لمدة 5 أيام عند 30 م°. يشير تشكل مناطق باهتة حول المستعمرة،

إلى نشاط إيجابي لتحليل البروتينات، تقاس أقطار النشاطية عن طريق طرح قطر المستعمرة من القطر الكلي للهالة.

3.2.9.2- إنتاج السيلولاز (Cellulase)

تم دراسة انتاج هذا الأنزيم من طرف السلالات البكتيرية باستعمال الوسط الصلب CMC (Carboxymethylcellulase agar)، تبعا للطريقة المقترحة من طرف Andriani و Park (2010). يتم زراعة السلالات البكتيرية الحديثة في شكل بقع على ثلاث أطباق محتوية على الوسط CMC. بعد 48 ساعة من الحضانة على درجة حرارة 30 م°، يتم إضافة الملون "أحمر الكونغو" إلى الأطباق لمدة 15 د. بعد ذلك، تغسل الأطباق جيدا باستعمال محلول NaCl (M1) وتركه مدة 15 د (Teather and Wood, 1982). تدل الهالات الباهتة المتشكلة حول المستعمرات البكتيرية على وجود انتاج للأنزيم، تقاس أقطار النشاطية بطرح قطر المستعمرة من القطر الكلي للهالة.

4.2.9.2- انتاج البكتيناز (Pectinase)

تم دراسة انتاج هذا الأنزيم من طرف السلالات البكتيرية باستعمال وسط صلب يعتمد على البكتين (Reddy et al., 2016) (ملحق 1). يتم زراعة السلالات البكتيرية الحديثة في شكل بقع على ثلاث أطباق محتوية على وسط البكتين. بعد 48 ساعة إلى 96 ساعة من الحضانة على درجة حرارة 30 م°، يتم الكشف عن النشاطية بإضافة 3 مل من محلول الأيودين عوضا عن محلول hexadecyltrimethyl ammonium bromide، إلى الأطباق. ظهور المناطق الباهتة حول المستعمرات البكتيرية يدل على نشاطية أنزيمية إيجابية (Reddy et al., 2016)، تقاس أقطار النشاطية بطرح قطر المستعمرة من القطر الكلي للهالة.

5.2.9.2- انتاج الكيتيناز (Chitinase)

تم تقدير النشاطية الأنزيمية المحللة للكيتين وفق الطريقة المذكورة من طرف Renwick وآخرين (1991). يتم زرع 10 µl من كل مزرعة بكتيرية عمرها 24 ساعة، على شكل بقع على ثلاث أطباق حاوية على وسط الكيتين، وفقا لما اقترحه Renwick وآخرين (1991) (ملحق 1).

تحضن الأطباق لخمسة أيام على درجة حرارة 30 م°. بعدها تغمر الأطباق بمحلول الليغول 'Lugol solution' (Djellel and Larous, 2018). يدل تشكل الهالات الباهتة حول المستعمرات البكتيرية عن النشاطية الأنزيمية الموجبة، تقاس أقطار النشاطية بطرح قطر المستعمرة من القطر الكلي للهالة.

10.2- تعريف السلالات البكتيرية

من أجل التعرف على أنواع البكتيريا الجذرية، تم إجراء عدة اختبارات أهمها تلوين غرام الذي يمكن من الفصل بين البكتيريا السالبة الغرام وهي الأنواع التابعة لجنس *Pseudomonas*، علما أنها قد أظهرت فلورة تحت UV بالطول الموجي 366 نانومتر، وبين البكتيريا الموجبة الغرام وهي الأنواع التابعة لجنس *Bacillus*، يتم تأكيد النتيجة الأخيرة باختبار اظهار الأبواغ عن طريق التلوين بأخضر المالاكيت (Green malachite) (Brenner et al., 2005).

من أجل معرفة الأنواع البكتيرية بدقة أكبر، تم إجراء التعريف الجزيئي للسلالات الخمس التي أظهرت أفضل نشاط معادي ضد النمو الشعاعي للميسيليوم الفطري، وهي B. B14، B. BB19، B. BB18، B. B16، B. S8 على أساس تضخيم ثم دراسة تسلسل المورثة المسؤولة عن s16 rRNA، اللذان تم إجراؤهما من طرف شركة Gene life sciences Inc - بلعباس، الجزائر. تم إجراء التتابع للنيكليوتيدات في المورثة المسؤولة عن s16 rRNA وفقاً لطريقة Sanger، باستخدام البادئة 1492R ذات التتابع -GGTTACCTTGTTACGACTT-5' (Miller et al., 2013). تم فيما بعد، مقارنة تسلسلات الـ DNA المتحصل عليها مع التسلسلات الموجودة في بنك المعلومات الجينية على مستوى NCBI (National Center for Biotechnology Information) باستعمال برنامج BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

11.2- فحص البكتيريا الجذرية من جهة نشاطها المعزز لنمو النباتي (Plant Growth Promotion)

1.11.2- إذابة الفوسفات (Phosphate solubilisation)

تم إجراء الدراسة الكيفية لإمكانية إذابة الفوسفات ثلاثي الكالسيوم اللاعضوي $(Ca_3(PO_4)_2)$ من طرف السلالات البكتيرية الأفضل في اختبار المواجهة المباشرة بين السلالات البكتيرية والفطرية وعددها 16 سلالة، على الوسط National Botanical Research Institute's Phosphate medium (NBRIP) (ملحق 1)، وفق الطريقة المقترحة من طرف Nautiyal (1999). توضع 5 µl من كل مزرعة بكتيرية، على شكل بقعة، على

وسط الزرع. بعد حضن الأطباق مدة 10 أيام على درجة حرارة 28 م°، يتم قياس قطر الهالة المحيطة بالمستعمرة البكتيرية، دون احتساب قطر المستعمرة، يمثل هذا القطر "قطر الإذابة" (التجربة من 3 مكررات). بالنسبة للتقدير الكمي، تُلَقَّح 3 أنابيب تحتوي على 10 مل من الوسط السائل NBRIP، بـ 100 µل من مزرعة كل سلالة بكتيرية. تحضن الأنابيب لمدة 10 أيام على 28 م° مع الرج المستمر على جهاز الرج (GLF 3006). الحضن، تخضع المزارع إلى الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة على جهاز (Hettich universal 2S)، لمدة 20 دقيقة. تقدر كمية الفوسفات في الجزء الطافي بالطريقة اللونية المقترحة من طرف Olsen و Sommers (1982). تم قياس امتصاص المركب الأزرق الناتج عند الطول الموجي 620 نانومتر باستعمال الجهاز "Shimazu 1640"، وبالتالي التعبير عن تركيز الفوسفات القابل للذوبان (P₂O₅) بالاعتماد على منحنى المعايرة القياسي بمحلول KH₂ PO₄.

2.11.2- إندول-3-حمض الخليك (Indole Acetic Acid)

من أجل اظهار انتاج IAA من طرف البكتيريا الجذرية، يتم تنمية 100 µل من البكتيريا المدروسة في أنابيب تحوي 10 مل من الوسط LB (Luria Bertani) مضاف إليه التربتوفان بتركيز 5 غ/ل (ثلاث أنابيب لكل سلالة). بعد 48 ساعة من الحضن على درجة حرارة 28 م°، تخضع المزارع البكتيرية إلى الطرد المركزي (5000 د/د لمدة 20 د) على جهاز (Hettich universal 2S). يمزج 1 مل من الجزء الطافي مع 2 مل من محلول Salkowski (50 مل من حمض الـ perchloric بتركيز 35% + 1 مل من محلول FeCl₃ بتركيز M0.5). يدل التغير إلى اللون الأحمر على إنتاج IAA (Gordon and Weber, 1951). تم تقدير كمية IAA في الجزء الطافي بالطريقة اللونية المقترحة من طرف Loper و Schroth (1968) وذلك بقياس الكثافة الضوئية عند 530 نانومتر بعد 30 دقيقة من الحضن على درجة حرارة الغرفة وفي الظلام بالاعتماد على منحنى المعايرة القياسي لمحلول IAA.

3.11.2- انتاج الأمونيا

تم اختبار انتاج الأمونيا (NH₃) من طرف السلالات البكتيرية بالطريقة، الكيفية، المقترحة من طرف Sherman و cappuccino (1992). يتم تلقيح ثلاث أنابيب تحوي 10 مل من الوسط (Peptone water) PW باستعمال 100 µل من مزرعة حديثة للبكتيرية المدروسة، تحضن الأنابيب لمدة 96 ساعة على درجة حرارة 28

م.° يضاف لكل أنبوب 500 µl من كاشف Nessler. يدل بتغيير لون الأنابيب الى اللون الأصفر أو البرتقالي على إنتاج الأمونيا.

4.11.2- إنتاج حاملات الحديد (Siderophore)

تم دراسة إنتاج حاملات الحديد بواسطة السلالات البكتيرية في الوسط CAS (Chrome Azuroil Agar) (ملحق 1) بالطريقة المقترحة من طرف Schwyn و Neiland (1987). من أجل ذلك، تم تلقيح وسط الزرع KB على شكل بقع بمزارع حديثة لكل سلالة (ثلاث أطباق لكل سلالة). بعد الحضان عند 28 م° لمدة 24 ساعة، يغطي الوسط KB بـ 15 مل من أجار CAS ذو اللون الأزرق. بعد مدة قصيرة من الاتصال، تشكل البكتيريا المنتجة لحاملات الحديد هالة برتقالية على الوسط الأزرق (Sahu and Sindhu, 2011). تم تقدير قطر إنتاج حاملات الحديد بطرح قطر المستعمرة البكتيرية من القطر الكلي (هالة + مستعمرة). فيما يخص التقدير الكمي، فقد تم وفقاً للطريقة التي وصفها كل من Schwyn و Neiland (1987) أيضاً، لكن باستخدام وسط KB السائل، باعتبار تركيبته الخالية من الحديد. يتم تلقيح أنابيب وسط الزرع انطلاقاً من مزارع ذات 48 ساعة بمعدل 1% (حجم/حجم) وحضنها في 28 م° لمدة 48 ساعة مع الرج المستمر (150 دورة/دقيقة) على جهاز الرج (GLF 3006). بعد الحضان، تخضع المزارع الى الطرد المركزي (5000 دورة/دقيقة لمدة 20 د) على جهاز (Hettich universal 2S)، يتم مزج 500 µl من الجزء الطافي مع 500 µl من محلول CAS ويحضان المزيج لمدة 30 د، في الظلام وعلى درجة حرارة الغرفة. يتغير اللون إلى البرتقالي وفقاً لكمية حاملات الحديد المنتجة. يقاس امتصاص المركب الناتج عند الطول الموجي 630 نانومتر مقابل محلول شاهد الذي يحتوي على 0.5 مل من الوسط غير الملقح و 0.5 مل من محلول CAS. يعبر عن كمية حاملات الحديد كنسبة مئوية وفقاً للصيغة التي اقترحها (Sayed et al., 2005):

$$\% \text{ وحدات حاملات الحديد} = \left(\frac{\text{إش} - \text{إع}}{\text{إش}} \right) \times 100$$

حيث: إش = امتصاصية الشاهد عند الطول الموجي 630 نانومتر.

إع = امتصاصية العينة في الطول الموجي 630 نانومتر.

5.11.2- تثبيت الأزوت الجوي

تم دراسة إمكانية السلالات البكتيرية من تثبيت الأزوت الجوي باستخدام الوسط الصلب الخالي من الأزوت (Winogradsky) (ملحق 1). تم تلقيح الوسط بجميع السلالات البكتيرية على شكل بقع ذات $10 \mu\text{l}$ لكل بقعة، تحضن الأطباق مدة 48 ساعة على درجة حرارة 30°C . يعتبر كل نمو على هذا الوسط دليلاً على إمكانية تثبيت الأزوت من طرف السلالة المعنية.

12.2- التحليل الإحصائي للنتائج

تم إجراء التحليل الإحصائي باستخدام برنامج SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) الإصدار 25 (www.ibm.com) بالإضافة إلى برنامج Microsoft Excel (2016). في جميع الاختبارات، تم استعمال "ANOVAs" مع اظهار الاختلافات المعنوية عن طريق اختبار Duncan عند العتبة $P < 0.05$. كما استعمل برنامج GraphPad من أجل الرسوم البيانية.

3- النتائج والمناقشة

1.3- المادة البكتيرية

بعد اجراء عملية العزل بحثنا عن أنواع بكتيرية تابعة للجنسين *Bacillus* و *Pseudomonas*، تم في النهاية الحصول على ما مجموعه 188 سلالة بكتيرية، 92 من الجنس *Pseudomonas* و 96 من الجنس *Bacillus*. تم تلخيص النتائج في الجدول II.1. اعتماد على الفرضية التي وضعها Edwards وآخرون (1994)، تمثلت الفكرة التي انطلقنا منها في أن منطقة المحيط الجذري، لكل من القمح والشعير، قد توفر فرصة لاختيار سلالات بكتيرية قوية كعوامل تحكم بيولوجي في نفس البيئة التي عزلت منها، حيث سيتم استخدامها ضد الفطريات الممرضة التي تصيب النبات الذي عزلت من محيطه الجذري. تم في هذه الدراسة الحصول على عدد كبير من السلالات البكتيرية، من النوعين *Bacillus* و *Pseudomonas* لأنها يعتبران من أكثر الأنواع البكتيرية التي تتميز بخاصيتي الضدية الفطرية من جهة، ولأنها قابلة للتنمية من جهة أخرى (Figuerola et al., 2016).

2.3- تأثير السلالات البكتيرية على النمو الشعاعي للميسيليوم الفطري

أجريت هذه الدراسة على جميع السلالات البكتيرية المتحصل عليها. من أجل تقدير تأثيرها على النمو الشعاعي للميسيليوم لثلاث عزلات فطرية أظهرت عدوانيتها تجاه بذور وشتلات وسنابل القمح (المحور السابق). أظهرت جميع السلالات البكتيرية ضدية تجاه العزلات الفطرية المختبرة، لكن التفاوت بينها كان واضحا، حيث أبدت بعض السلالات ضدية ضعيفة جدا لم تتعد 20%، خصوصا بالنسبة لأنواع *Pseudomonas*، وأظهرت سلالات أخرى ضدية متوسطة لم تتعد 50%، بينما أبدت سلالات أخرى ضدية معتبرة، خصوصا بالنسبة لأنواع *Bacillus*، تعدت في بعض الحالات عتبة 75% (ملحق 3).

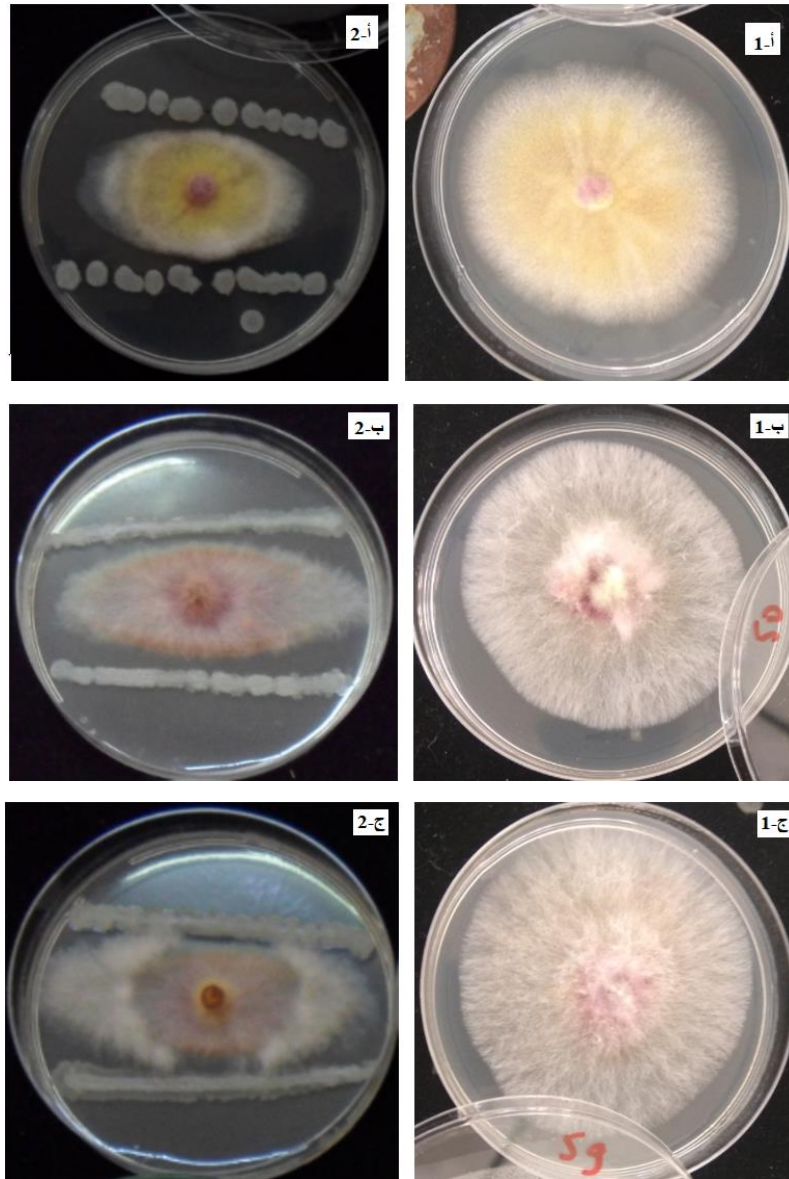
نظرا لكثرة السلالات البكتيرية المختبرة، فقد ارتأينا أن إظهار النتائج الخاصة بالسلالات الأكثر فعالية، من كلا الجنسين المختبرين جد كاف، وقد تم توضيح النتائج المتحصل عليها في الجدول II.2.

بالنسبة للسلالات المختارة وهي 11 سلالة *Bacillus* و 5 سلالات *Pseudomonas*، فقد أظهرت كلها فعالية ضد نمو الميسيليوم لجميع العزلات الفطرية المختبرة، عند اختبارها على كلا وسطي الزرع PDA و NA باستعمال تقنية الزرع المزدوج (شكل II.3). توضح من خلال النتائج أن السلالات التابعة للجنس *Bacillus* كانت الأكثر فعالية بالمقارنة مع السلالات التابعة للجنس *Pseudomonas* (جدول II.2). على الوسط PDA، كانت معدلات نسبة تثبيط النمو الفطري، بغض النظر عن السلالة البكتيرية، متقاربة بالنسبة للعزلتين FC1 و FC2 مساوية لـ 56.05% و 55.56% على الترتيب، بينما كانت مساوية لـ 49.56% مع FCh.

جدول 1.11. المواقع الجغرافية لمختلف عينات التربة مع عدد السلالات من كل عينة.

العينة	الولاية	المنطقة	دائرة العرض	خط الطول	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonase</i>
B1	BATNA	AIN DJASSER	35.8831423	5.9724798	3	0
B3	BATNA	AIN DJASSER	35.8748159	5.9783304	3	5
B5	BATNA	AIN DJASSER	35.858169	5.984319	3	0
B7	BATNA	ZANA EL BAIDA	35.815564	6.0948711	1	4
B9	BATNA	ZANA EL BAIDA	35.806405	6.129539	3	1
B12	BATNA	SERIANA	35.7759742	6.1601795	0	1
B. B14	BATNA	SERIANA	35.740647	6.179318	2	5
B. B.	BATNA	SERIANA	35.740079	6.19825	2	4
B18	BATNA	LAZRO	35.7692212	6.2171664	2	3
B. B20	BATNA	LAZRO	35.79405944	6.2215518	2	0
M2	MILA	MCHIRA	35.9774272	6.2447425	2	3
B. M4	MILA	MCHIRA	36.017538	6.2312708	2	1
M6	MILA	MCHIRA	36.0426357	6.2210985	3	3
B. M8	MILA	MCHIRA	36.0634684	6.2016444	2	4
M11	MILA	CHELGHOUIM	36.0895026	6.1749494	1	2
M17	MILA	OULED KHLOUF	36.0785517	6.0809725	3	4
BB1	BBA	TAGHROUT	36.0992292	5.1825022	3	2
P.BB4	BBA	OULED MOUSSLI	36.1122913	5.112228	3	4
BB9	BBA	AIN TASSERA	36.1118633	5.0252188	2	3
BB12	BBA	AIN TASSERA	36.0859097	5.0115171	3	3
P.BB15	BBA	AIN TASSERA	36.0472055	4.9799378	4	3
B.	BBA	AIN TASSERA	36.0593116	5.0143338	4	3
B.	BBA	BIR KASD ALI	36.12938773	5.0327431	3	4
S1	SETIF	AIN KBIRA	36.3665626	5.5161379	2	1
P.S5	SETIF	AMOUCHA	36.3663175	5.4681981	2	3
B. S8	SETIF	AMOUCHA	36.3373248	5.414282	3	3
S9	SETIF	OURICIA	36.3055221	5.4063785	2	2
S12	SETIF	MAWAN	36.2922061	5.3469646	3	4
S14	SETIF	AIN ABESSA	36.300262	5.3044988	3	3
S17	SETIF	AL KHARBA	36.2393209	5.281972	3	3
P. S18	SETIF	AIN TRICK	36.1541195	5.4441916	1	2
B. S21	SETIF	AL HASSI	36.181188	5.4633439	3	0
P.S26	SETIF	FERMATOU	36.2135858	5.3699544	2	2
B. S29	SETIF	BOUHIRA	36.2205262	5.2796723	1	3
B. S33	SETIF	MEZLOUG	36.0976284	5.3397803	2	0
S37	SETIF	OULED MELLOUL	36.0222997	5.331458	2	2
S38	SETIF	KESR AL ABTAL	36.0119407	5.3230681	1	2

بالاعتماد على معدلات نسب التثبيط، بغض النظر عن النوع الفطري، تبين أن السلالات B. BB19، B. S8 و BB18 هي الأفضل من حيث الضدية بمعدلات تثبيط نمو الميسيليوم قدرت بـ 68.30%، 67.52% و 66.69% على الترتيب. على العكس من ذلك، تبين أن السلالة P. S18 كانت الأضعف بمعدل قدر بـ 29.17%. من جهة أخرى، كانت معدلات نسب التثبيط على الوسط NA، بغض النظر عن السلالة البكتيرية، مساوية لـ 54.10% مع FC1، 59.54% مع FC2 و 53.47% مع FCh.



شكل II.3. نتائج المواجهة المباشرة بين السلالة البكتيرية B. B16 والفطر: أ= FCh، ب= FC1، ج= FC2.

بغض النظر عن النوع الفطري، وجد على نفس الوسط أن السلالة B. B16 هي أفضل سلالة مضادة، من بين جميع السلالات المختبرة، بمعدل تثبيط قدر بـ 69.83% متبوعة بالسلالة B. BB19 ثم B. B14 بمعدلات مساوية لـ 66.82% و 64.82% على الترتيب، بينما وجد أن السلالة P.BB15 هي الأضعف بمعدل تثبيط قدر بـ 23.75%.

بالاعتماد على نسب التثبيط مع كل فطر على حدة، وجد، على الوسط PDA، أن السلالة B. BB19 هي الأفضل بمعدل تثبيط وصل 73.49% مع FC1، أما على الجيلوز المغذي فقد كانت السلالة B. B14 هي الأفضل بمعدل 79.41% مع FCh (جدول 2.II).

جدول 2.II. نسب تثبيط النمو الشعاعي للميسيليوم الفطري لثلاث عزلات فطرية عن طريق السلالات البكتيرية الجذرية وباستعمال طريقة الزرع المزدوج*.

المعدل		معدل تثبيط النمو الشعاعي						السلالات	
		<i>F. culmorum</i> (FC1)		<i>F. culmorum</i> (FC2)		<i>F. chlamydosporum</i> (FCh)			
NA	PDA	NA	PDA	NA	PDA	NA	PDA		
23.75a	38.27c	18.42±0.01a	39.77±1.14b	17.54±2.0a	35.23±2.28cd	32.23±2.95a	30.82±1.02b	P.BB15	Pseudomonase
45.77b	41.02d	48.25±1.32c	45.45±3.94c	42.98±3.0b	43.18±4.55d	46.04±0.1b	31.40±2.01b	P. BB4	
40.23b	32.12ab	42.98±1.52bc	37.88±4.73b	39.47±1.1b	38.05±3.98bc	38.24±0a	20.18±1.37a	P. S26	
40.93bc	31.10b	40.35±1.52b	42.41±0.67b	49.12±1.1c	35.15±2.28b	33.33±1.7a	25±0.58a	P. S5	
42.81c	29.17a	40.35±1.52b	11.36±2.28a	42.98±0.1b	9.47±0.66a	45.1±3.39b	69.12±4.4f	P. S18	
61.62g	66.69h	65.34±0.1ef	70.28±2.78ef	67.57±5.41de	70.28±1.39h	51.96±3.39c	59.52±2.18de	B. S8	Bacillus
64.46hi	59.29ef	63.16±2.63de	60.24±3.62d	68.47±0.1def	61.45±2.08ef	61.76±2.95d	56.19±1.65cde	B. B20	
63.01gh	58.05e	57.89±0.1d	60.64±0.70d	69.37±1.56def	60.64±1.39ef	61.76±2.95d	52.86±1.43cd	B. S29	
59.24f	57.97e	63.16±0.1de	60.64±1.39d	68.47±1.56def	61.85±0.69ef	46.08±0.1b	48.71±2.87c	B. M8	
64.82hi	59.28ef	42.98±1.52bc	62.25±1.39d	72.07±3.12fg	62.25±1.39efg	79.41±2.94f	53.33±1.65cde	B. B14	
64.62hi	67.52h	67.54±1.52ef	71.49±0.7ef	68.47±1.56def	71.08±2.08h	57.84±3.39d	60.00±2.86e	B.BB18	
54.70e	63.28g	43.86±1.9bc	68.27±1.84ef	65.31±2.12d	65.86±3.48fgh	60.78±1.7d	55.71±2.02cde	B. S33	
66.82i	68.30h	67.54±1.52ef	73.49±1.21f	65.27±1.9ef	71.89±0.7h	67.65±0e	59.52±0.83de	B.BB19	
57.41h	61.16fg	60.95±3.06d	61.85±1.84d	69.37±1.56def	70.68±0.69h	58.82±0.1d	50.95±0.83c	B. S21	
64.69hi	59.33ef	65.79±2.63ef	60.64±1.84d	68.47±1.56def	63.05±1.39efg	59.80±0.1d	54.29±2.86cde	B. M4	
69.83j	63.26g	71.05±2.63f	66.27±1.21de	75.68±2.71g	68.27±0.69gh	62.75±4.4d	55.24±2.18cde	B. B16	
		54.1	56.05	59.01	55.52	53.81	49.56	المعدلات	

* القيم المعطاة عبارة عن معدلات (n = 3) مع الانحراف المعياري. القيم في نفس العمود المتبوعة بنفس الحرف لا تختلف معنويًا في P < 0.05 (اختبار Duncan للاختلافات المعنوية).

بينت دراسة تحليل التباين أن جميع العزلات البكتيرية والفطرية تختلف فيما بينها اختلاف معنويًا بشكل كبير جدا ($P < 0.001$) على كلا الوسطين المستعملين. تدل هذه النتائج على أن النوع الفطري يؤثر في مدى فعالية البكتيريا المدروسة، أي أن حساسية الفطريات تختلف تجاه الأنواع البكتيرية، حيث ظهر أن الـ FC2 كان الأكثر حساسية متبوعا بـ FC1 ثم FCh (جدول 3.II). تظهر النتائج أن التفاعل بين المتغيرات (وسط الزرع، العزلات البكتيرية والفطرية) كان معنويًا بشكل كبير جدا أيضا ($P < 0.001$) وهذا يدل على التأثير المشترك الفعال لهذه المتغيرات على نسب التثبيط المتحصل عليها.

جدول 3.II. تحليل التباين لتأثير كل من وسط الزرع والنوع الفطري على النشاطية الضدية للسلاسل البكتيرية تجاه عزلات الـ *Fusarium*.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	65841,164 ^a	95	693,065	58,453	,000
Intercept	856687,050	1	856687,050	72252,474	,000
Media_Culture	317,877	1	317,877	26,810	,000
Bacteria	45538,033	15	3035,869	256,043	,000
Fungi	1498,336	2	749,168	63,184	,000
Media_Culture * Bacteria	3489,302	15	232,620	19,619	,000
Media_Culture * Fungi	704,020	2	352,010	29,688	,000
Bacteria * Fungi	8318,336	30	277,278	23,385	,000
Media_Culture * Bacteria * Fungi	5975,260	30	199,175	16,798	,000
Error	2276,516	192	11,857		
Total	924804,730	288			
Corrected Total	68117,680	287			

3.3- تأثير المركبات الطيارة على نمو عزلات الـ *Fusarium*

أظهرت جميع السلالات المختبرة نشاطية ضدية، أي إنتاج المركبات الطيارة المضادة للفطريات، مع وجود اختلاف كبير بينها، من خلال تثبيط نمو الميسيليوم لكل من FC1 وFC2، حيث سجلت نسب تثبيط بين 4.14%، في وجود FC2 وB. S29 و72.08% في وجود FC1 وB. M4. بالنسبة للعزلة FCh، وجد أن السلالات البكتيرية B. S33، B. M8 وB. BB18 لم تبد أية نشاطية ضدية، أي أنها لم تنتج المركبات الطيارة المضادة للفطريات، أما مع باقي السلالات البكتيرية، كانت نسب التثبيط بين 2.5% و50.6% مع كل من السلالتين B. BB19 وB. S8 على الترتيب.

بغض النظر عن النوع البكتيري، سجلت معدلات تثبيط متقاربة بين العزلات الفطرية الثلاث، قدرت بـ 24.22% مع FC1، 23.8% مع FC2 و 20.96% مع FCh. بصفة عامة، أعطت السلالة B. S21 أكبر معدل تثبيط وهو 42.96% بينما أعطت السلالة B. S29 أصغر معدل تثبيط قدر بـ 6.93%. من جهة أخرى، أعطت السلالة B. M4 أكبر نسبة تثبيط مع FC1 وهي 72.08% (جدول 4.II).

جدول 4.II. تأثير المركبات الطيارة البكتيرية على نمو الميسيليوم الفطري (المواجهة غير المباشرة) *.

المعدل	نسب تثبيط النمو الشعاعي			السلالة البكتيرية
	FC1	FC2	FCh	
19.73d	26.25±2.5d	28.52±0.7g	4.43±0.24b	B. B16
11.63bc	9.58±0.72a	25.30±1.21f	0.00±0.00a	B. S33
10.76b	11.25±0.00ab	16.51±0.74cd	4.43±0.41b	B. B14
36.34g	12.00±1.8ab	46.42±3.94j	50.60±1.59h	B. BB19
6.93a	11.25±0.00ab	4.14±0.62a	5.40±0.69b	B. S29
42.96i	45.78±4.17g	42.33±4.87i	40.77±4.61fg	B. S21
38.40h	72.08±1.91h	18.12±1.14cd	25.00±0.00cd	B. M4
12.09bc	14.58±1.44b	21.69±1.21 ^e	0.00±0.00a	B. M8
8.39a	11.25±1.25ab	13.92±1.52b	0.00±0.00a	B. BB18
13.13c	20.42±1.44c	16.46±1.39bc	2.50±0.00ab	B. S8
33.67g	46.37±4.21g	15.26±0.69bc	42.37±2.72g	B. B20
35.57g	19.17±0.72c	44.38±1.86i	43.17±3.63g	P.BB15
29.22f	31.25±1.25 ^e	33.73±1.21h	22.67±2.52c	P.BB4
22.35e	10.83±1.44ab	17.67±0.69c	38.54±1.21f	P. S18
18.37d	10.58±0.63a	15.66±1.21bc	28.85±1.15 ^e	P. S5
27.51f	34.94±2.41f	21.08±0.61de	26.50±1.21de	P. S26
	24.22	23.83	20.96	المعدل

* القيم المعطاة عبارة عن معدلات (n = 3) مع الانحراف المعياري. القيم في نفس العمود المتبوعة بنفس الحرف لا تختلف معنويًا في P < 0.05 (اختبار Duncan للاختلافات المعنوية).

بينت الدراسة الإحصائية وجود اختلاف معنوي بشكل كبير جدا ($P < 0.001$) بين كل من السلالات البكتيرية فيما بينها والعزلات الفطرية فيما بينها. تدل هذه النتائج أن حساسية الفطريات تختلف باختلاف السلالات البكتيرية، حيث وجد أن الـ FC1 كانت الأكثر حساسية، متبوعة بـ FC2 ثم أخيرا الـ FCh. وجد من جهة أخرى، أن التفاعل بين السلالات البكتيرية والفطرية كان معنويا بشكل كبير جدا ($P < 0.001$)، وهذا يدل على التأثير المشترك لكل من العزلات الفطرية والبكتيرية على نسب التثبيط (جدول 5.II).

أظهرت دراسة الارتباط عدم وجود أي ارتباط بين العناصر المدروسة (جدول 6.II). تدل هذه النتائج أن تأثير البكتيريا على الفطريات المدروسة في كل من المواجهة المباشرة وغير المباشرة غير مرتبط ببعضه البعض، مما يدل على وجود اختلاف في المواد الفعالة المنتجة وآليات تأثيرها في كلا الطريقتين. عموما، تم التوصل إلى أن النشاطية الضدية كانت أفضل في المواجهة المباشرة مقارنة بالمواجهة غير المباشرة.

جدول 5.II. تحليل التباين لتأثير المركبات الطيارة البكتيرية النمو الشعاعي لعزلات الـ *Fusarium*.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	36554,316 ^a	47	777,751	210,490	,000
Intercept	76192,101	1	76192,101	20620,577	,000
BACTERIA	19499,159	15	1299,944	351,816	,000
FUNGI	304,783	2	152,391	41,243	,000
BACTERIA * FUNGI	16750,374	30	558,346	151,110	,000
Error	354,716	96	3,695		
Total	113101,133	144			
Corrected Total	36909,032	143			

جدول 6. II. دراسة الارتباط بين نتائج المواجهة المباشرة وغير المباشرة للعزلات البكتيرية والفطرية.

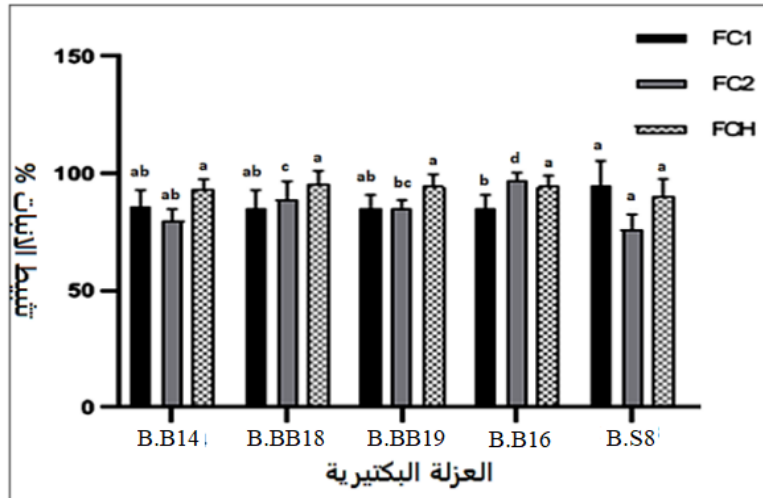
	Bacteria	Fungi	Inh_Dir_Conf	Inh_Indir_Conf
Bacteria	1			
Fungi	,000	1		
Inh_Dir_Conf	,629**	-,166*	1	
Inh_Indir_Conf	,024	-,083	,010	1

** . La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral).

* . La corrélation est significative au niveau 0.05 (bilatéral).

4.3- تأثير السلالات البكتيرية على انبات ونمو الكونيديات الفطرية

تم تقدير تأثير السلالات البكتيرية الخمسة الأكثر فعالية في اختبار الضدية المباشرة، وهي B. BB19، B. BB18، B. B14 و B. S8، على انبات الكونيديات لثلاث عزلات فطرية FC1، FC2، FCh. خفضت جميع السلالات المختبرة نسب انبات الكونيديات بشكل كبير. بالنسبة للعزلة FC1، كانت نسب التثبيط بين 76.67% مع B. S8 و 94.55% مع B. B16، أما بالنسبة للعزلة FC2، فقد كانت نسب التثبيط بين 76.2% وهي أصغر نسبة بين جميع نسب التثبيط و 97.2% وهي أكبر نسبة تم تسجيلها، مع كل من العزلتين B. S8 و B. B16 على الترتيب. أخيراً، مع العزلة FCh كانت نسب التثبيط بين 81.73% و 95.32% مع كل من العزلتين B. S21 و B. BB18 على الترتيب (شكل 4.II).



شكل 4.II. نسب تثبيط انبات الكونيديات الفطرية باستعمال سلالات البكتيرية الجذرية من الجنس *Bacillus*. القيم المعطاة عبارة عن معدلات (n=6) مع الانحراف المعياري. الأعمدة ذات اللون الواحد، المؤشرة بنفس الحرف لا تختلف معنوياً في $P < 0.05$ (اختبار Duncan للاختلافات المعنوية).

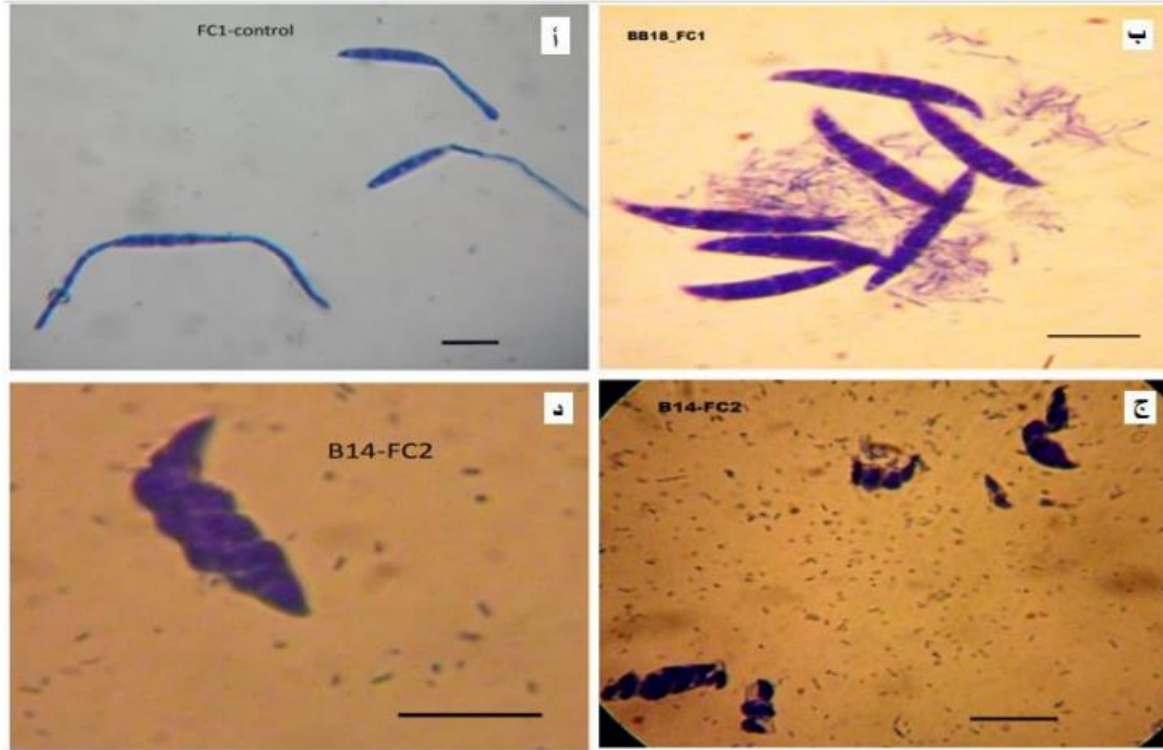
أظهرت الدراسة الإحصائية وجود فرق معنوي بشكل كبير ($P < 0.01$) بين كل من السلالات البكتيرية والعزلات الفطرية فيما بينها. تدل هذه النتيجة على أن السلالات البكتيرية المختلفة لا تؤثر على العزلات الفطرية بنفس الضدية، كما أن حساسية العزلات الفطرية تجاه البكتيريا تختلف أيضاً حيث ظهر أن العزلة FCh كانت الأكثر حساسية متبوعة بالعزلتين FC1 ثم FC2 (جدول 7.II). أظهرت النتائج أيضاً، أن التفاعل بين السلالات

البكتيرية والعزلات الفطرية كان معنويا بشكل كبير جدا ($P < 0.001$)، وهذا يدل على التأثير المشترك الكبير لكل من السلالات البكتيرية والعزلات الفطرية على نسب تثبيط عملية الإنبات.

جدول 7. II. تحليل التباين لتأثير السلالات البكتيرية على نسب انبات الكونيديات الفطرية.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4031,675 ^a	17	237,157	5,793	,000
Intercept	844000,768	1	844000,768	20615,214	,000
BACTERIA	1717,208	5	343,442	8,389	,000
FUNGI	534,145	2	267,072	6,523	,002
BACTERIA * FUNGI	1780,322	10	178,032	4,349	,000
Error	3684,661	90	40,941		
Total	851717,104	108			
Corrected Total	7716,336	107			

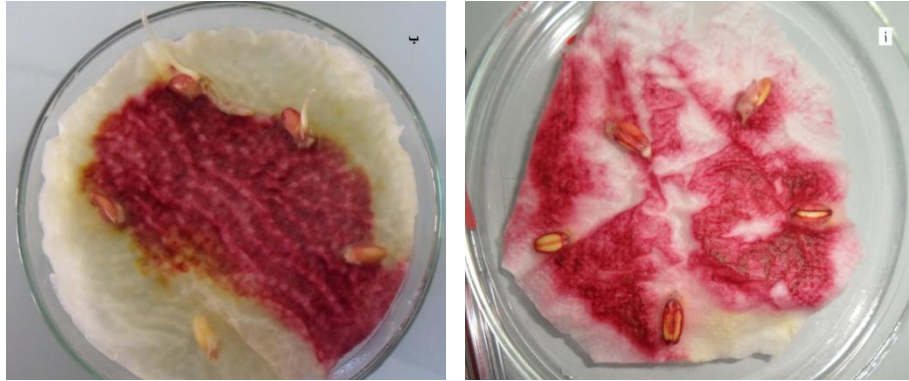
من جهة أخرى، لوحظ حدوث عدة تشوهات على مستوى الكونيديات الكبيرة لكل من العزلتين FC1 و FC2 بعد 24 ساعة من الحضان مع السلالة البكتيرية B. B14. تمثلت هذه التشوهات في تغير شكل الكونيديات من الشكل المغزلي الطبيعي (شكل II.5.أ) الى كونيديات تبدو خلاياها منتفخة، متراسة وملتفة، ما أدى الى تخفيض طولها، وفي بعض الأحيان الى تفكيكها بالكلية، بسبب شدة الالتفاف (شكل II.5.ج.د). إضافة الى ذلك، لوحظ تجمع خلايا البكتيريا B. BB18 حول الكونيديات الكبيرة لكل من FC1 و FC2، ما سبب منع حدوث عملية الإنبات (شكل II.5.ب).



شكل 5.II.5. تأثير السلالات البكتيرية على الكونيديات الكبيرة لعزلاتي الـ FC1 وFC2 بعد 24 ساعة من الزرع (سلم الرسم 50µم).

5.3- دراسة المكافحة الحيوية في المخبر "In vitro"

تم تقدير تأثير السلالات البكتيرية الأكثر فعالية (خمس سلالات) على طول كل من غمد الريشة والجذور بعد أربعة أيام من الامراض الاصطناعي باستعمال كل من عزلاتي *F. culmorum* (FC1 وFC2). أدى نفع بذور القمح في المزارع البكتيرية، لكل من السلالتين B. BB18 و B. BB19، الى الحصول على وقاية معنوية ($p < 0.05$) ضد تخفيض كل من طول غمد الريشة والجذور وعدد فروع الجذور، الناتج عن كل من FC1 وFC2، بالمقارنة مع الشواهد الموجبة. بينما أظهرت السلالة B. S8 نفس الفعالية، لكن في وجود الـ FC2 فقط. أعطت السلالة B. B16 نتائج مماثلة أيضا، غير أنها لم تكن قادرة على وقاية النمو الطولي للجذور بشكل معنوي ($P > 0.05$)، في وجود FC1 (شكل 6.II). على العكس من ذلك، أعطت السلالة B. B14 تأثيرا إيجابيا بسيطا في وجود الـ FC1 فقط.



شكل 6.II. التأثير الوقائي للسلاطات البكتيرية على غمد الريشة في وجود *F.culmorum* (أ: بدون بكتيريا، ب: في وجود السلالة B. B16، حيث يظهر انحصار الفطر في المركز مع ظهور استطالة غمد الريشة في بذرتين من خمس).

عموما، أظهرت النتائج في وجود العزلة FC2 أن السلالة B. S8 كانت الأفضل من حيث وقاية النمو الطولي لكل من غمد الريشة والجذور بمعدلات مساوية لـ 41.67% و 25.56% على الترتيب، بينما كانت السلالة B. BB19 هي الأفضل من حيث وقاية عدد فروع الجذور بمعدل 35.54%. أما في وجود العزلة FC1، فقد كانت السلالة B. B16 هي الأفضل من حيث وقاية النمو الطولي لغمد الريشة بمعدل 39.67%، وكانت السلالة B. S8 هي الأفضل من وقاية النمو الطولي للجذور بمعدل 22.87%، وأخيرا، كانت السلالة B.BB19 هي الأفضل من حيث وقاية عدد فروع الجذور بمعدل 32.47%. على العكس من ذلك، وجد أن السلالة B. B14 هي الأضعف مع العزلة الفطرية FC2، كما كان لها تأثير سلبي على طول كل من غمد الريشة والجذور وعدد فروعها مع العزلة الفطرية FC1 (جدول 8.II).

أظهرت الدراسة الإحصائية أن السلالات البكتيرية والفطرية تختلف فيما بينها اختلافا معنويا بشكل كبير ($P < 0.01$) من حيث تأثيرها الوقائي على طول كل من غمد الريشة والجذور وعدد فروعها كذلك. تدل هذه النتائج أن القدرة الوقائية البكتيرية لهذه العناصر غير متساوية بين السلالات البكتيرية المختبرة، كما تدل على أن حساسة العزلتين الفطريتين تجاهها تختلف أيضا، حيث يمكن بالرجوع الى النتائج، التوصل الى أن FC2 كان أكثر حساسية للبكتيريا مقارنة بـ FC1 (جدول 9.II).

جدول 8.II. معدلات التخفيض والوقاية لطول كل من غمد الريشة والجذور وعدد فروعها*.

CLR (%)	CLP	RLR (%)	RLP	NRBR (%)	NRBP	الشاهد
79.29±4.03c	0.00±0.00a	78.59±4.78b	0.00±0.00a	61.49±11.74b	0.00±0.00a	
50.04±7.61a	36.88±9.6c	60.62±5.11a	22.87±6.5b	48.78±3.66a	20.67±5.95b	B. S8-FC1
81.24±5.12c	-2.46±0.96a	79.63±0.74b	-1.33±0.93a	68.29±2.11b	-11.06±3.44a	B. B14-FC1
47.83±2.42a	39.67±3.06c	76.88±0.5b	2.17±0.63a	41.67±7.22a	32.21±11.74b	B. B16-FC1
61.74±2.95b	22.13±3.73b	62.09±9.57a	21.00±3.82b	46.95±4.84a	22.65±7.87b	B. BB18-FC1
61.74±5.91b	22.13±7.45b	63.74±5.58a	18.90±7.1b	41.46±6.34a	32.57±10.31b	B. BB19-FC1
91.23±1.27b	0.00±0.00a	91.91±2.7d	0.00±0.00a	88.92±3.98c	0.00±0.00a	الشاهد
53.21±9.61a	41.67±10.04b	68.42±6.84a	25.56±7.44d	65.85±8.45ab	25.94±9.5bc	B. S8-FC2
84.89±0.84b	6.95±0.93a	86.94±1.88cd	5.41±2.05ab	74.39±3.66b	16.34±4.11b	B. B14-FC2
87.56±1.12b	4.02±1.23a	83.67±2.38c	8.97±2.59b	57.82±8.96a	34.97±10.08c	B. B16-FC2
59.55±8.05a	34.73±8.83b	69.20±2.21a	24.71±2.41d	62.20±7.62ab	30.05±8.57c	B. BB18-FC2
60.03±4.7a	34.20±5.15b	75.83±3.8b	17.50±4.14c	57.32±5.59a	35.54±6.29c	B. BB19-FC2

NRBP: نسبة وقاية عدد فروع الجذور، NRBR: نسبة تخفيض عدد فروع الجذور، RLP: نسبة وقاية طول الجذور، RLR: نسبة تخفيض طول الجذور، CLP: نسبة وقاية طول غمد الريشة، CLR: نسبة تخفيض طول غمد الريشة. * القيم المعطاة عبارة عن معدلات (n= 15) مع الانحراف المعياري. النسب الموجودة في نفس العمود، المتبوعة بنفس الحرف تعتبر غير مختلفة معنوياً عند P<0.05 (اختبار Duncan للاختلافات المعنوية).

6.3- دراسة المكافحة الحيوية في الدفيئة "in planta"

خضعت كلا عزلتى النوع *F. culmorum* (FC1 و FC2) معايير النمو النباتي المدروسة عندما تم استخدامها بدون بكتيريا (الشواهد الموجبة)، مقارنة مع شتلات القمح غير المصابة (الشواهد السالبة). بدت بعض الشتلات المعالجة بالسلالات البكتيرية (B. S8 و B. B16، B. BB19) ثم بالعزلتين FC1 و FC2، أشبه بكثير من الشواهد السلبية، أي أنها تبدو غير مصابة، مقارنة مع الشتلات المعالجة بالعزلتين FC1 و FC2 فقط (شكل 7.II).

بالنسبة للعزلة FC1، أظهرت النتائج أن طلي (تغليف) البذور باستعمال السلالة البكتيرية B. B16، يخفض بشكل معنوي (p<0.01) من امراضية الفطر عندما يتعلق الأمر بكل من الطول والوزن الطازج لكل من النظامين الجذري والهوائي. أعطت السلالة B. BB19 النتائج نفسها، باستثناء أنها لم تحم بشكل معنوي (p>0.05) طول النظام الجذري. أما بالنسبة للعزلة FC2، فقد أظهرت النتائج أن تغليف البذور بالسلالة البكتيرية B. BB19 يخفض بشكل معنوي (p<0.01) من امراضية الفطر عندما يتعلق الأمر بكل من الطول والوزن الطازج لكل من النظامين الجذري والهوائي.

جدول 9. II. تحليل التباين للتأثير الوقائي للسلاسل البكتيرية على طول كل من غمد الريشة والجذور وعدد فروعها.

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Col_Length_Prev	9859,262 ^a	9	1095,474	15,868	,000
	Root_Length_Prev	2915,551 ^b	9	323,950	4,801	,002
	N_of_Branchs_Prev	6927,426 ^c	9	769,714	7,106	,000
Intercept	Col_Length_Prev	15918,797	1	15918,797	230,589	,000
	Root_Length_Prev	165864,442	1	165864,442	2458,337	,000
	N_of_Branchs_Prev	124146,607	1	124146,607	1146,127	,000
Fungus	Col_Length_Prev	804,558	1	804,558	11,654	,003
	Root_Length_Prev	659,320	1	659,320	9,772	,005
	N_of_Branchs_Prev	1475,185	1	1475,185	13,619	,001
Bacteria	Col_Length_Prev	8711,751	4	2177,938	31,548	,000
	Root_Length_Prev	2200,201	4	550,050	8,152	,000
	N_of_Branchs_Prev	5331,736	4	1332,934	12,306	,000
Fungus * Bacteria	Col_Length_Prev	342,953	4	85,738	1,242	,325
	Root_Length_Prev	56,029	4	14,007	,208	,931
	N_of_Branchs_Prev	120,506	4	30,126	,278	,889
Error	Col_Length_Prev	1380,704	20	69,035		
	Root_Length_Prev	1349,404	20	67,470		
	N_of_Branchs_Prev	2166,367	20	108,318		
Total	Col_Length_Prev	27158,764	30			
	Root_Length_Prev	170129,397	30			
	N_of_Branchs_Prev	133240,400	30			
Corrected Total	Col_Length_Prev	11239,966	29			
	Root_Length_Prev	4264,955	29			
	N_of_Branchs_Prev	9093,793	29			

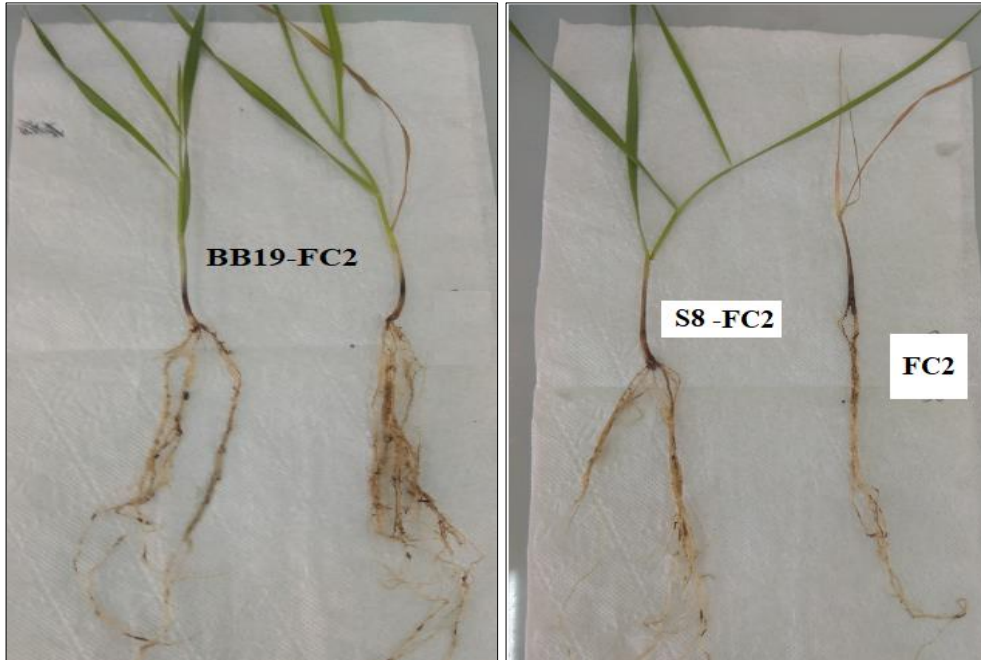
بصفة عامة، وجد أن أفضل سلالة بكتيرية وقائية مع العزلة FC1، هي السلالة B. B16، بأصغر معدلات تخفيض لطول كل من النظامين الجذري والهوائي مساوية لـ 11.06% و 2.78% أي ما يعادل نسب وقاية مساوية لـ 79.26% و 92.97% على الترتيب، وبمعدلات تخفيض للوزن الطازج لكلا النظامين الجذري والهوائي مساوية لـ 31.29% و 23.89% أي ما يعادل نسب وقاية مساوية لـ 65.54% و 59.99% على الترتيب.

من جهة أخرى، كانت السلالة B. BB19 هي السلالة الوقائية الأفضل، في وجود العزلة FC2، بأصغر معدلات تخفيض لطول كل من النظام الجذري والهوائي مساوية لـ 15.93% و 8.57% أي ما يعادل نسب وقاية مساوية لـ 64.48% و 72.26% على الترتيب، وبمعدلات تخفيض للوزن الطازج لكلا النظامين الجذري

والهوائي مساوية لـ 30.74% و 4.28% أي ما يعادل نسب وقاية مساوية لـ 60.46% و 90.13% على الترتيب.

على العكس من ذلك، كانت السلالة B. B14 هي أضعف سلالة وقائية، كما أنها أظهرت تأثيرا سلبيا على شتلات القمح خاصة في وجود العزلة FC2 (جدول 10.II).

أظهرت الدراسة الإحصائية أن السلالات البكتيرية تختلف فيما بينها اختلافا معنويا بشكل كبير جدا ($P < 0.001$) من حيث تأثيرها الوقائي على الطول والوزن الطازج لكل من النظامين الجذري والهوائي. تدل هذه النتائج أن القدرة الوقائية البكتيرية لمعايير النمو، غير متماثلة بين السلالات البكتيرية المختبرة. من جهة أخرى، أظهرت النتائج وجود اختلاف معنوي بشكل كبير ($P < 0.01$) بين العزلتين الفطريتين، لكن فقط، فيما يخص نسب تخفيض الطول والوزن الطازج للنظام الهوائي، وهذا يدل على أن حساسة العزلتين الفطريتين تجاه البكتيريا غير متماثل، حيث يمكن بالرجوع الى النتائج ملاحظة أن العزلة FC1 كانت أكثر حساسية للبكتيريا مقارنة بالعزلة FC2 (جدول 11.II).



شكل 7.II. التأثير الوقائي للسلالات البكتيرية على شتلات القمح في وجود *F.culmorum*.

جدول 10.II. تأثير السلالات البكتيرية على معايير النمو النباتي في وجود عزلي *F.culmorum* *.

الاختبار	%FWRR	%FWVR	%RSLR	%VSLR
الشاهد الإيجابي FC1	59.71±10.55c	90.81±1.54c	39.55±5.07c	53.32±7.54c
B. S8- FC1	45.10±7.79b	43.23±18.4ab	28.93±3b	39.98±11.1bc
B. B14- FC1	61.32±3.94c	53.36±16.5ab	44.05±11.99c	43.16±11.27c
B. BB19- FC1	29.95±6.3a	32.43±10.22ab	28.38±3.82b	25.70±7.0ab
B. BB18- FC1	42.78±5.56b	56.18±13.47b	19.99±2.22b	42.11±9.5c
B. B16- FC1	23.89±5.72a	31.29±5.54a	2.78±0.79a	11.06±0.56a
الشاهد الإيجابي FC2	43.37±8.75bc	77.74±6.25c	30.89±6.15c	44.85±8.25cd
B. S8-FC2	27.09±8.69b	56.54±15.7b	14.98±5.32ab	34.07±7.45bc
B. B14- FC2	61.14±16.58d	81.63±7.42c	59.39±3.01d	71.01±7.97e
B. BB19- FC2	4.28±1.41a	30.74±4.67a	8.57±2.21a	15.93±4.27a
B. BB18- FC2	49.02±2.53cd	74.79±4.02c	31.87±8.22c	51.43±7.52d
B. B16- FC2	34.22±6.3bc	54.42±9.91b	23.84±5.11bc	31.84±5.02b

VSLR: نسبة تخفيض طول النظام الهوائي، RSLR: نسبة تخفيض طول النظام الجذري، FWVR: نسبة تخفيض الوزن الطازج للنظام الهوائي، FWRR: نسبة تخفيض الوزن الطازج للنظام الجذري. * القيم المعطاة عبارة عن معدلات (n=9) مع الانحراف المعياري. النسب الموجودة في نفس العمود، المتبوعة بنفس الحرف تعتبر غير مختلفة معنوياً عند P<0.05 (اختبار Duncan للاختلافات المعنوية).

7.3- توضيح آلية العدائية البكتيرية تجاه عزلات الـ *Fusarium*

استطاعت جميع السلالات المختبرة إنتاج أحد المركبات المضادة للفطريات على الأقل، كما أن بعضها استطاعت إنتاج جميع المركبات المدروسة في المختبر.

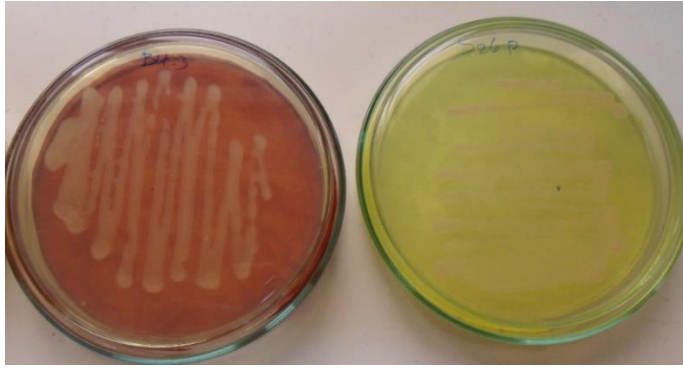
1.7.3- إنتاج سيانيد الهيدروجين (HCN)

تعتبر السلالة البكتيرية منتجة لغاز سيانيد الهيدروجين إذا تغير لون ورق الترشيح بداخل غطاء التطبيق من اللون الأصفر نحو اللون البني الداكن (شكل 8.II). من بين جميع السلالات التابعة للنوع *Bacillus*، لم تستطع إلا سلالة واحد إنتاج الـ HCN وهي B. B14. على العكس من ذلك، بالنسبة للسلالات التابعة للنوع *Pseudomonas*، فقد كانت كلها منتجة باستثناء سلالة واحدة، وهي P.S26.

جدول 11.11. تحليل التباين لتأثير السلالات البكتيرية على معايير النمو النباتي في وجود عزلاتي

F.culmorum

Source	Dependent Variable	Type III Sum of	df	Mean	F	Sig.
Corrected Model	Veg_sys_length_red	8149,031 ^a	9	905,448	14,847	,000
	Roo_sys_length_red	7482,116 ^b	9	831,346	26,929	,000
	FWVS_red	8342,695 ^c	9	926,966	6,776	,000
	FWRS_red	8755,529 ^d	9	972,837	13,093	,000
Intercept	Veg_sys_length_red	40246,846	1	40246,846	659,936	,000
	Roo_sys_length_red	20717,050	1	20717,050	671,074	,000
	FWVS_red	79447,036	1	79447,036	580,731	,000
	FWRS_red	42680,180	1	42680,180	574,419	,000
Fungus	Veg_sys_length_red	535,941	1	535,941	8,788	,008
	Roo_sys_length_red	63,017	1	63,017	2,041	,169
	FWVS_red	1999,037	1	1999,037	14,612	,001
	FWRS_red	250,043	1	250,043	3,365	,082
Bacteria	Veg_sys_length_red	6011,694	4	1502,923	24,644	,000
	Roo_sys_length_red	5372,075	4	1343,019	43,504	,000
	FWVS_red	5552,091	4	1388,023	10,146	,000
	FWRS_red	6935,327	4	1733,832	23,335	,000
Fungus * Bacteria	Veg_sys_length_red	1601,396	4	400,349	6,565	,002
	Roo_sys_length_red	2047,024	4	511,756	16,577	,000
	FWVS_red	791,567	4	197,892	1,447	,256
	FWRS_red	1570,160	4	392,540	5,283	,005
Error	Veg_sys_length_red	1219,720	20	60,986		
	Roo_sys_length_red	617,429	20	30,871		
	FWVS_red	2736,103	20	136,805		
	FWRS_red	1486,031	20	74,302		
Total	Veg_sys_length_red	49615,598	30			
	Roo_sys_length_red	28816,595	30			
	FWVS_red	90525,834	30			
	FWRS_red	52921,740	30			
Corrected Total	Veg_sys_length_red	9368,751	29			
	Roo_sys_length_red	8099,545	29			
	FWVS_red	11078,798	29			
	FWRS_red	10241,560	29			



شكل 8.II. إنتاج HCN من طرف السلالات البكتيرية (اليمن: اختبار سلبي. اليسار: اختبار ايجابي).

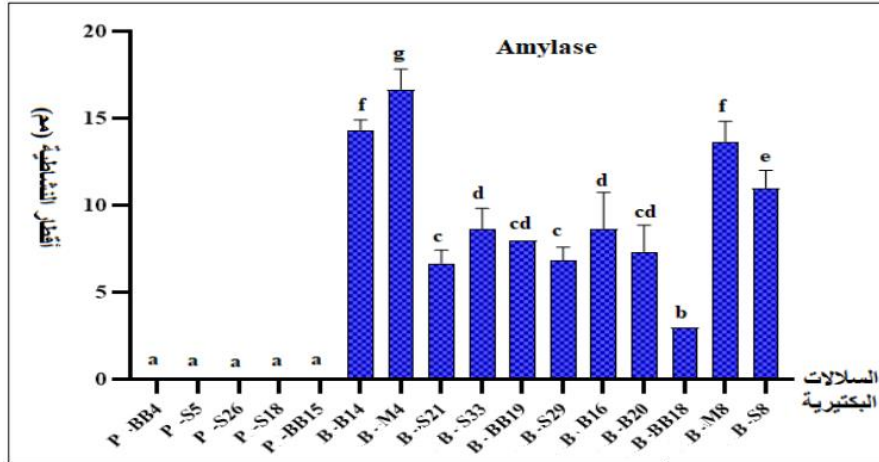
2.7.3- إنتاج أنزيمات هدم الجدار الخلوي الفطري

1.2.7.3- إنتاج الأميلاز

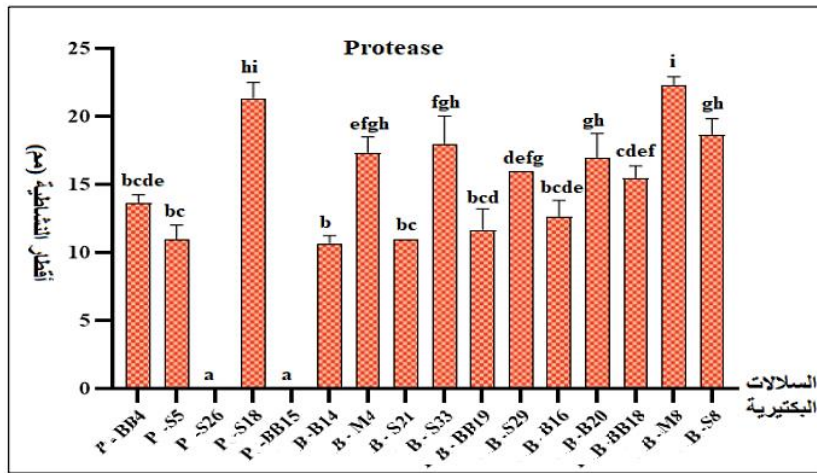
تعتبر السلالة البكتيرية منتجة لأنزيم الأميلاز في حال تشكل الهالة الشفافة حول مستعمرتها، في حين يتلون باقي الوسط باللون الأزرق الغامق بعد إضافة الليغول (شكل 14.II). أنتجت جميع السلالات التابعة للجنس *Bacillus* هذا الأنزيم ولكن مع تسجيل تباين في أقطار النشاطية الناتجة. عموماً، تراوحت معدلات أقطار النشاطية بين 3 مم، مع السلالة B. BB18 و 16.67 مم، مع السلالة B. M4، وهو أكبر قطر مسجل، كما يؤكد ذلك نتائج دراسة التباين أين حصلنا على فرق معنوي بشكل كبير جداً ($P < 0.001$) بين هذه القيمة وباقي القيم الأخرى. بالمقابل، كانت كل السلالات التابعة للجنس *Pseudomonas*، غير منتجة لهذا الأنزيم (شكل 9.II).

2.2.7.3- إنتاج البروتياز

تعتبر السلالة البكتيرية منتجة لأنزيم البروتياز في حال تشكل الهالة الشفافة حول مستعمرتها (شكل 14.II). بعد 48 ساعة من الحضانة في 30 م°، ظهر أن جميع السلالات التابعة للجنس *Bacillus* أنتجت هذا الأنزيم ولكن مع تفاوت في أقطار النشاطية الناتجة. بالنسبة لهذه المجموعة، تراوحت معدلات أقطار النشاطية بين 10.67 مم، مع السلالة B. B14 و 22.33 مم، مع السلالة B. M8. أظهرت نتائج دراسة التباين أن هذا الأخير يعتبر أكبر قطر تم الحصول عليه من بين جميع الأقطار المسجلة، كما وجد فرق معنوي بشكل كبير جداً ($P < 0.001$) بين هذه القيمة وباقي القيم الأخرى. بالنسبة للسلالات التابعة للجنس *Pseudomonas*، فقد اختلفت النتائج قليلاً، بحيث أن السلالتين P. BB15 و P. S26 لم تنتج هذا الأنزيم، وعلى العكس من ذلك أنتجت السلالات الأخرى بمعدلات أقطار بين 11 مم، مع السلالة P.S5 و 20.33 مم، مع السلالة P. S18 (شكل 10.II).



شكل 9.II. معدلات أقطار نشاطية أنزيم الأميلاز المنتج من طرف السلالات البكتيرية. القيم المعطاة عبارة عن معدلات (n= 3) مع الانحراف المعياري. الأعمدة المؤشرة بنفس الحرف تعتبر غير مختلفة معنويًا عند $P < 0.05$ (اختبار Duncan للاختلافات المعنوية).

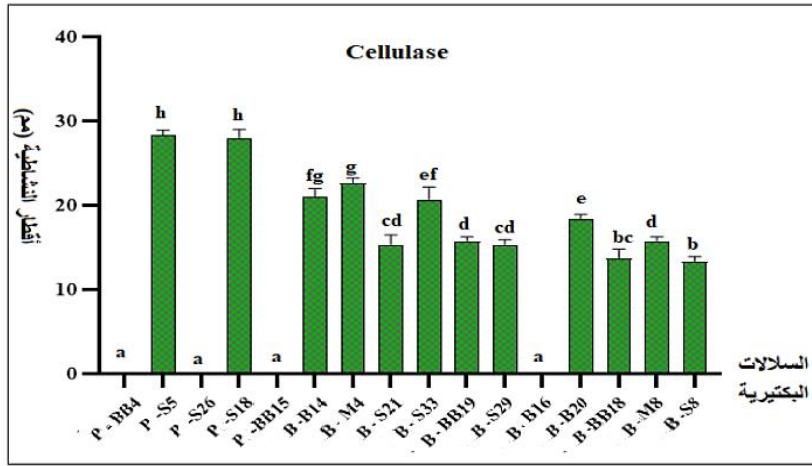


شكل 10.II. معدلات أقطار نشاطية أنزيم البروتياز المنتج من طرف السلالات البكتيرية. القيم المعطاة عبارة عن معدلات (n= 3) مع الانحراف المعياري. الأعمدة المؤشرة بنفس الحرف تعتبر غير مختلفة معنويًا عند $P < 0.05$ (اختبار Duncan للاختلافات المعنوية).

3.2.7.3- إنتاج السيولوز

تعتبر السلالة البكتيرية منتجة لأنزيم السيولوز في حال تشكل الهالة الشفافة حول مستعمرتها، مع بقاء كامل الوسط باللون الأحمر (شكل 14.II). بعد 5 أيام من الحضانة في 30 م°، ظهر أن جميع السلالات التابعة للجنس *Bacillus* أنتجت هذا الأنزيم، ما عدا السلالة B. B16، ولكن مع تسجيل اختلاف في أقطار النشاطية

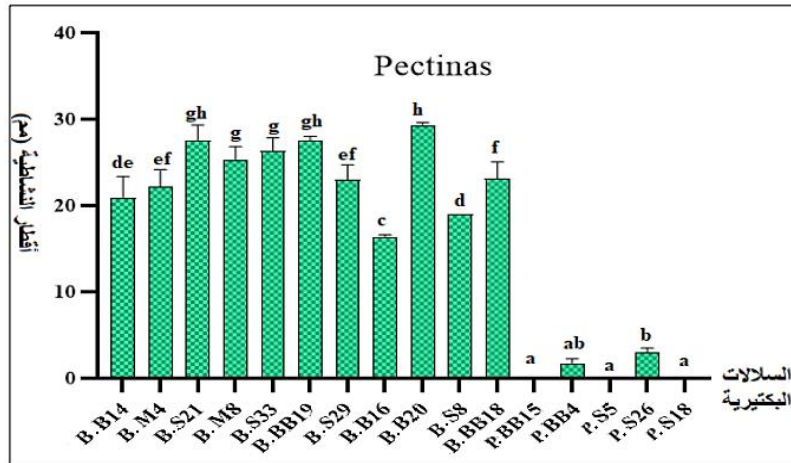
الناتجة. تراوحت معدلات أقطار النشاطية، بالنسبة لهذه المجموعة، بين 13.33 مم، مع السلالة B. S8 و22.67 مم، مع السلالة B. M4. بالنسبة للسلالات التابعة للجنس *Pseudomonas*، فقد كانت النتائج مختلفة، بحيث أن السلالتين P. S5 و P. S18 فقط من أنتجتا هذا الأنزيم، كما أظهرت نتائج دراسة التباين أن هاتين الأخيرتين سجلتا أكبر معدل قطر نشاطية من بين جميع الأقطار المسجلة من خلال وجود فرق معنوي بشكل كبير جدا ($P < 0.001$) بين هاتين القيمتين وباقي القيم الأخرى (شكل 11.II).



شكل 11.II. معدلات أقطار نشاطية أنزيم السيلولاز المنتج من طرف السلالات البكتيرية. القيم المعطاة عبارة عن معدلات ($n = 3$) مع الانحراف المعياري. الأعمدة المؤشرة بنفس الحرف تعتبر غير مختلفة معنويًا عند $P < 0.05$ (اختبار Duncan للاختلافات المعنوية).

4.2.7.3- إنتاج البكتيناز

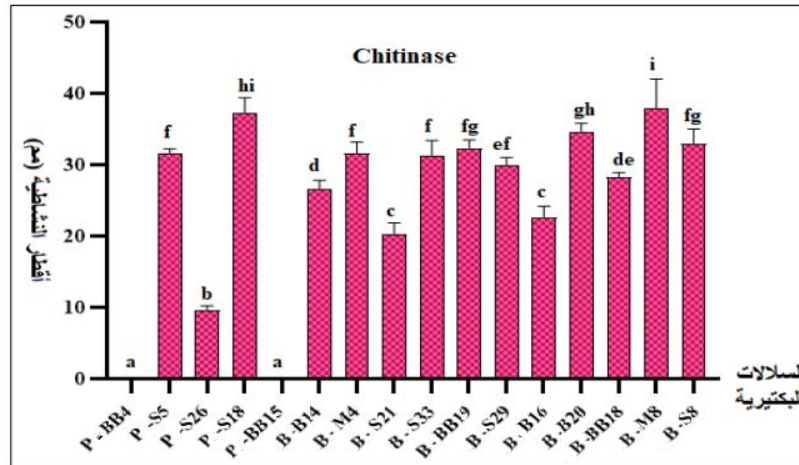
بعد الحضان لمدة 72 ساعة على درجة حرارة 30 م°، يمكن القول عن سلالة بكتيرية ما، أنها منتجة لأنزيم البكتيناز في حال ظهور هالة شفافة حول المستعمرة، في حين يتلون باقي الوسط باللون الأزرق الغامق بعد إضافة الكاشف (Lugol) (شكل 14.II). من خلال معدلات أقطار النشاطية، نلاحظ أن جميع السلالات التابعة للجنس *Bacillus* أنتجت هذا الأنزيم ولكن مع تفاوت في أقطار النشاطية الناتجة. بصفة عامة، كانت معدلات أقطار النشاطية لأفراد هذه المجموعة بين 16.33 مم، مع السلالة B. B16 و29.33 مم، مع السلالة B. B20. يعتبر هذا الأخير أكبر قطر مسجل، ويؤكد ذلك نتائج دراسة التباين حيث وجد فرق معنوي بشكل كبير جدا ($P < 0.001$) بين هذه القيمة وباقي القيم الأخرى. بالمقابل، بالنسبة للسلالات التابعة للجنس *Pseudomonas*، فلم تنتج هذا الأنزيم إلا سلالتين فقط هما P. BB4 و P. S26، بكميات ضئيلة جدا (شكل 12.II).



شكل 12. II. معدلات أقطار نشاطية أنزيم البكتيناز المنتج من طرف السلالات البكتيرية. القيم المعطاة عبارة عن معدلات (n= 3) مع الانحراف المعياري. الأعمدة المؤشرة بنفس الحرف تعتبر غير مختلفة معنويًا عند $P < 0.05$ (اختبار Duncan للاختلافات المعنوية).

5.2.7.3- إنتاج الكيتيناز

بعد الحضانة لمدة 5 أيام على درجة حرارة 30 م°، يمكن معرفة إنتاج أنزيم الكيتيناز من خلال ظهور هالة شفافة حول المستعمرة المنتجة، في حين يتلون باقي الوسط باللون الأزرق الغامق بعد إضافة الكاشف (Lugol) (شكل 14. II). أظهرت النتائج أن جميع السلالات التابعة للجنس *Bacillus* أنتجت هذا الأنزيم ولكن مع تسجيل تفاوت ملحوظ في أقطار النشاطية الناتجة. يمكن حصر معدلات أقطار النشاطية لأفراد هذه المجموعة بين 20.33 مم، مع السلالة B. S21 و38 مم، مع السلالة B. M8. يعتبر هذا الأخير أكبر قطر تم تسجيله بالمقارنة مع باقي الأقطار، ويؤكد ذلك نتائج دراسة التباين حيث وجد فرق معنوي بشكل كبير جدا ($P < 0.001$) بين هذه القيمة وباقي القيم الأخرى. بالمقابل، بالنسبة للسلالات التابعة للجنس *Pseudomonas*، وجد أن 3 سلالات فقط، من بين 5 سلالات، استطاعت إنتاج هذا الأنزيم بمعدلات أقطار نشاطية بين 9.67 مم، مع P.S26 و37.33 مم، مع P. S18 (شكل 13. II).



شكل II.13. معدلات أقطار نشاطية أنزيم الكيتيناز المنتج من طرف السلالات البكتيرية. القيم المعطاة عبارة عن معدلات (n= 3) مع الانحراف المعياري. الأعمدة المؤشرة بنفس الحرف تعتبر غير مختلفة معنوياً عند $P < 0.05$ (اختبار Duncan للاختلافات المعنوية).

8.3- تعريف البكتيريا

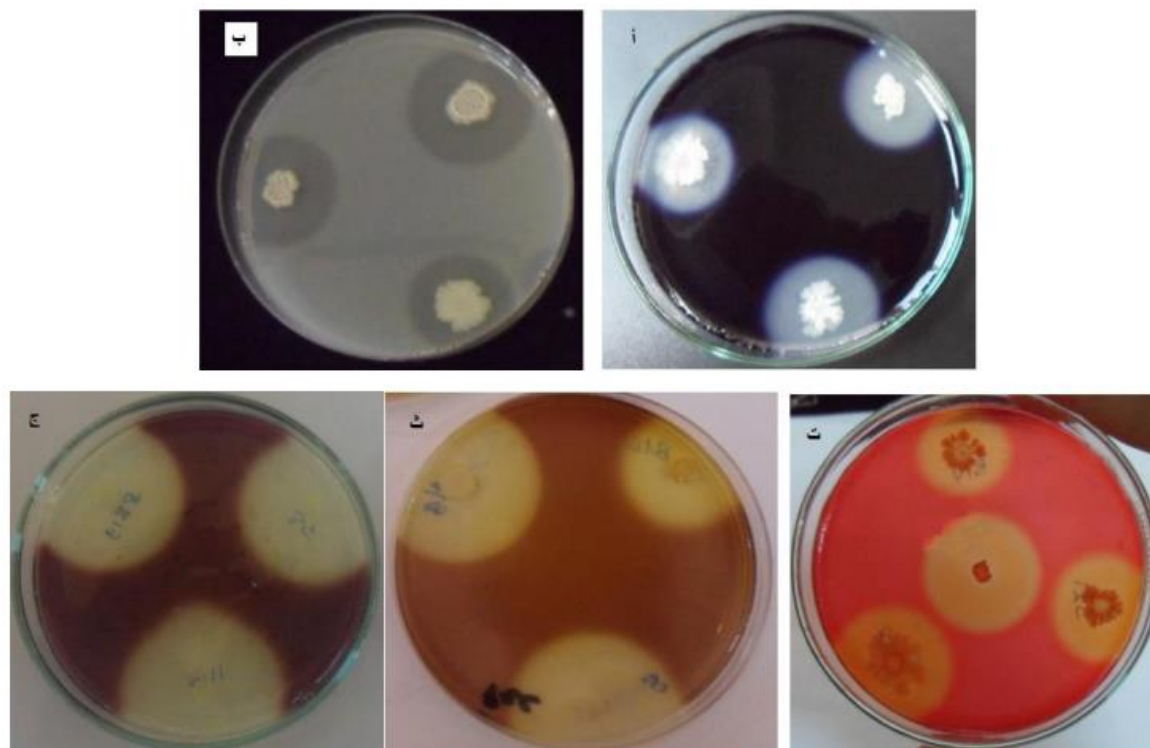
1.8.3- التعريف المظهري

تم التعرف الأولي على جنس السلالات البكتيرية المختبرة في كل من المواجهة المباشرة وغير المباشرة (16 سلالة) من خلال صبغة غرام، متبوعاً بالكشف عن وجود الأبواغ الداخلية للسلالات الموجبة الغرام، حيث ظهرت السلالات التابعة لجنس *Bacillus*، على أنها عصيات موجبة الغرام، منتجة للأبواغ الداخلية. أما بالنسبة للسلالات التابعة للجنس *Pseudomonas*، فقد كانت عبارة عن عصيات سالبة الغرام، كما أنها قادرة إنتاج صبغة خضراء على وسط الزرع، تبدي فلورة تحت الأشعة فوق البنفسجية. ساعد اختبار النشاطية الأنزيمية للأميلاز في عملية التعريف، حيث أنتجت سلالات *Bacillus* هذا الأنزيم، بينما لم تنتج سلالات *Pseudomonas*.

2.8.3- التعريف الجزيئي

من أجل معرفة الأنواع التي تنتمي إليها بدقة، تم القيام بالتعريف الجزيئي للسلالات الخمسة الأفضل في اختبار المواجهة المباشرة، من خلال دراسة التسلسل النيكلوتيدي للـ 16S rDNA. أظهرت مطابقة (alignment) التسلسل النيكلوتيدي للسلالات المختارة مع التسلسلات النيكلوتيديّة للجينات المشفرة للـ 16S rRNA المتحصل عليها من قاعدة البيانات "Genbank" (ملحق 2)، تشابهاً قوياً مع الجينات المشفرة لـ 16S rRNA لجنس *Bacillus*. بعد التعرف على السلالات، تم تسميتها وفق الرموز التالية: *Bacillus atrophaeus* B16.

كما *Bacillus subtilis* S8، *Bacillus amyloliquefaciens* BB19، *Bacillus amyloliquefaciens* BB18، *subtilis* B14 تم الحصول على أرقام الدخول من نفس قاعدة البيانات (الجدول 12.II).



شكل 14.II. اختبارات الكشف عن مختلف الأنزيمات المحللة: أ: الأميلاز، ب: البروتيناز، ت: السيلولاز، ث: البكتيناز، ج: الكيتيناز.

جدول 12.II. ملخص التعريف الجزيئي للسلاطات البكتيرية المختارة.

رقم الدخول	التسمية المقترحة	نسبة	النوع الموافق	السلالة
MT072217	<i>Bacillus atrophaeus</i> B16	%100	<i>Bacillus atrophaeus</i>	B. B16
MT072216	<i>Bacillus subtilis</i> B14	%99.15	<i>Bacillus subtilis</i>	B. B14
MT072218	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BB18	%97.18	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	B. BB18
MT072219	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BB19	%99.17	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	B. BB19
MT077868	<i>Bacillus subtilis</i> S8	%98.02	<i>Bacillus subtilis</i>	B. S8

يعتبر مرض تعفن التاج (FCR)، مرضا خطيرا تسببه عدة أنواع من جنس الـ *Fusarium* أهمها النوع *F. culmorum*، وهو من بين أكثر الأنواع تواجدا في شمال الجزائر، خاصة في المناطق المناخية شبه الرطبة وشبه الجافة (Abdallah et al. 2019). الهدف من هذه الدراسة هو البحث، ثم اختيار السلالات البكتيرية، انطلاقا من المحيط الجذري لنبات القمح أو الشعير، ذات القدرة الضدية تجاه كل من *F. culmorum* و *F. Chlamydosporum*، قادرة على منع أو إزالة مرض الذبول الفيوزاريومي في القمح.

أظهر التشخيص الجزيئي بواسطة دراسة تسلسل 16S rDNA، أن أفضل خمس سلالات بكتيرية من حيث الضدية، هي أعضاء في جنس *Bacillus*. تعتبر النتائج التي المتحصل عليها متفقة مع التقارير السابقة لكل من Palazzini وآخرين (2007) و Yang وآخرون (2009)، الذين أظهروا أن غالبية البكتيريا الجذرية للقمح تنتمي إلى جنس *Bacillus*. يضم هذا الأخير أكثر السلالات الضدية لمسببات الأمراض النباتية، التي توفر حماية قوية للنباتات ضد أمراض الـ *Fusarium* (Liu et al. 2009).

بناء على النتائج المتحصل عليها، خفضت جميع السلالات البكتيرية المختبرة (16/16) من النمو الشعاعي "في المختبر" لعزلات الـ *Fusarium* المختبرة، باستعمال تقنية الزرع المزدوج، وهي نسبة أعلى من تلك التي حصلت عليها Mnasri وآخرون (2016) وهي 108/86، من بيئة مماثلة وهي منطقة المحيط الجذري. ذكرت هذه الأخيرة أن المواد القابلة للانتشار في الوسط تلعب دورا كبيرا في القضاء على الفطريات الممرضة للنبات، كما أن أفراد جنس *Bacillus* معروفون بإنتاجهم الكبير لهذه المواد. اكتشف Dunlap وآخرون (2011)، أن كل من *Bacillus subtilis* و *Bacillus megaterium* بإمكانهما إنتاج مستقلبات ذات قدرة تثبيطية أو قاتلة للفطريات وهي fengycin lipopeptides، surfactin و iturin. صرح Baffoni وآخرون (2015)، أن السلالة *Bacillus amyloliquefaciens* يمكنها تثبيط نمو كل من *F. culmorum* و *F. graminearum*، وقد أرجع هذه الفعالية إلى إنتاج المضادات الحيوية أو إلى التنافس على الغذاء. عموما، ترجع فعالية التثبيط الملاحظ بين الكائنات الدقيقة المختبرة، إلى كمية وفعالية المادة المضادة المنتجة.

تعتبر معدلات التثبيط المتحصل عليها، بالنسبة لأفراد *Bacillus*، قريبة مما توصل اليه Figueroa وآخرين (2016)، الذين تحصلوا على معدلات بين 49% و 85% على الوسط PDA، بينما كانت أقل مما توصلوا اليه (بين 49% و 67%) بالنسبة لأفراد *Pseudomonas*. تؤكد هذه النتائج أيضا، ما تم التوصل اليه من أن أنواع الـ *Bacillus* كانت أفضل بالمقارنة مع أنواع الـ *Pseudomonas*.

بالنسبة لوسط الزرع المستعمل، تم الحصول على معدلات تثبيط أعلى بقليل على الوسط NA بالمقارنة مع الوسط PDA، يمكن أن يرجع هذا إلى أن الوسط NA يعتبر أكثر ملاءمة للنمو البكتيري، كما أنه أقل ملاءمة

للنمو الفطري، أي أن النمو الفطري يتأثر سلباً بكل من وسط الزرع (يكون الغزل الفطري عليه غالباً قليل الكثافة) والسلالة البكتيرية. يؤكد هذه النتائج ما تم التوصل إليه من طرف Sahu و Sindhu (2011)، اللذان توصلا أيضاً إلى أن تثبيط *F. oxysporum* يكون أفضل على NA مقارنة بالوسط PDA.

من جهة أخرى، لاحظنا أن 100% من السلالات البكتيرية المدروسة أظهرت تثبيطاً عن بعد في اختبار فعالية المواد الطيارة، لعزلاتي *F. culmorum* و 80% لعزلة *F. chlamydosporum*. يتدخل إنتاج المركبات الطيارة، مثل HCN، من طرف البكتيريا الجذرية، في القضاء على مسببات الأمراض المختلفة وعلى الفطريات على وجه التحديد (Michelsen and Stougaard, 2012). تتفق هذه المعلومة مع ما تم التوصل إليه بالنسبة لأفراد جنس *Pseudomonas*، فقد توافقت النشاطية المعتبرة، بالمقارنة مع أفراد جنس *Bacillus*، مع إنتاج سلالات هذه المجموعة لـ HCN. على العكس من ذلك، أظهرت نتائجنا أن سلالة واحدة فقط، من بين سلالات *Bacillus*، وهي B. B14، يمكنها إنتاج هذه المادة. في نفس الوقت، كان لهذه السلالة تأثير ضدي ضعيف، في الاختبار غير المباشر للضدية، مقارنة بالسلالات الأخرى التي لم تكن منتجة لـ HCN. قد يكون هذا بسبب إنتاج مركبات طيارة أخرى غير HCN، حيث أفاد Zou وآخرون (2007)، أن البكتيريا الجذرية يمكن أن تنتج العديد من المركبات الطيارة، ذات النشاط المضاد للفطريات، بخلاف HCN، مثل acetamide·benzaldehyde و benzothiazole. كما أظهر Yuan وآخرون (2012)، أن البكتيريا *Bacillus amyloliquefaciens* بإمكانها إنتاج 36 مركب طيار كلها ذات فعالية في تثبيط نمو الميسيليوم ونبات الكونيديات لفطر *F. oxysporum*، كما استطاع نوعان منها (2,3,6-trimethylphenol و benzothiazoles phenol) تثبيط النمو الفطري بشكل كلي. من جهة أخرى، تعتبر نسب التثبيط المتحصل عليها في هذا الاختبار، خاصة مع النوع *F. culmorum*، أفضل بكثير مما توصل إليه Arfaoui وآخرون (2006) في نفس الاختبار، حيث تحصلوا على نسب بين 0 و 10.71%، باستعمال أنواع مختلفة من البكتيريا الجذرية، ضد *F. oxysporum*.

تم تخفيض انبات الكونيديات لكل من النوعين *F. culmorum* و *F. chlamydosporum* بشكل كبير جداً باستعمال الخلايا الخضرية لجميع السلالات المختبرة، يمكن أن يرجع ذلك إلى إنتاج هذه السلالات لبعض المستقلبات، القابلة للذوبان، المثبثة لهذه العملية (Dunlap et al., 2011 ; Yuan et al., 2012). إضافة إلى ذلك، لوحظ وجود تشوهات وتفكيك لبعض الكونيديات الكبيرة لـ *F. culmorum* من طرف السلالة B. B14، يمكن أن ترجع هذه الظاهرة إلى تخريب الجدار الخلوي للكونيديات من طرف الأنزيمات المحللة المنتجة من طرف البكتيريا، حيث وجد كل من Sempere و Santamarina (2014) أن المستقلبات الخارج خلوية المنتجة من طرف *Trichoderma harzianum*، بما في ذلك الأنزيمات مثل الكيتيناز، الغليكاناز والبروتياز، يمكنها هدم الجدار

الخلوي لـ *F. culmorum*. توصلت Mahmoud وآخرون (2008) أيضا الى أن البكتيريا الجذرية الأكثر انتاجا لأنزيم البكتيناز، تكون أكثر فعالية في محاربة الفطريات الممرضة لجذور البطاطا. تؤكد هذه النتائج ما تم التوصل اليه في بحثنا فيما يخص انتاج السلالات البكتيرية للأنزيمات المحللة، حيث كانت هناك علاقة واضحة بين السلالات الأكثر نشاطية ضد الفطريات والأنزيمات المحللة المنتجة وكمياتها. أظهرت النتائج أن جميع السلالات ذات الضدية العالية استطاعت إنتاج جميع الأنزيمات المختبرة وكميات معتبرة، ماعدا السلالة B. B16 التي لم تنتج أنزيم السيلولاز. يمكن استعمال هذه النتائج في شرح آلية النشاطية الضدية للبكتيريا الجذرية لمنع نمو العزل الفطري ولمنع انبات كونيديات عزلات الـ *Fusarium* وتشويهاها أو حتى تفكيكها.

بما أن التحكم في *F. culmorum* عن طريق اختيار الأصناف المقاومة مقيد بنقص جينات المقاومة في المادة الوراثية النباتية، فانه يمكن تحسين مقاومة البذور باستخدام تقنية التغليف الحيوي (Bio-coating) وهي طريقة واعدة لرفع مستوى مقاومة أنواع القمح ضد أمراض الـ *Fusarium* (Mnasri et al., 2016).

سمحت لنا دراسة الضدية (المواجهة المباشرة)، باختيار السلالات الأكثر نشاطية في تثبيط النمو الشعاعي للميسيليوم للعزلات الفطرية المختبرة. أظهرت النتائج "المخبرية" أن السلالات B. B16، B. S8، B. BB18 و B. BB19 يمكنها تخفيض حدة الإصابة، بشكل معنوي، في كل من بذور وشتلات القمح المصابة بـ *F. culmorum*. يمكن أن يرجع هذا التأثير، الى الضدية المباشرة تجاه الممرض، من خلال انتاج المواد المضادة للفطريات (بما في ذلك الأنزيمات المحللة) في وسط الزرع، انتاج المواد الطيارة و/أو الى تحسين النمو النباتي (Comby et al., 2017 ; Muller et al., 2016).

أعطت السلالات البكتيرية السالفة الذكر نسب وقاية لطول غمد الريشة محصورة بين 22.13% و 39.67% في وجود FC1. تعتبر هذه النتائج أفضل من التي توصل اليها Khan وآخرون (2005)، حيث تحصلوا على نسب بين 7% و 26% عند استعمال السلالة *Bacillus mycooides*. على العكس، وجد أن النتائج المتحصل عليها، الخاصة بوقاية طول الجذور، باستعمال السلالات نفسها مع FC2 (بين 5.41% و 25.56%)، كانت أقل قليلا من النسب التي تحصلت عليه Mnasri وآخرون (2016) والتي كانت بين 10.24% و 33.32%. وبالمثل، أظهرت جميع السلالات المختبرة ضد FC2 وجميع السلالات باستثناء B. B14 ضد FC1، فعالية في الحد من التأثير السلبي للفطريات على عدد فروع الجذور بنسب متفاوتة تجاوزت 30%. تتوافق هذه النتائج مع ما توصل اليه Akinrinlola وآخرون (2018)، الذين تحصلوا على زيادة في النسبة المئوية لعدد الجذور الجانبية بين 17 و 50% عند استخدامهم لبعض سلالات *Bacillus*.

أعطت المكافحة الحيوية لـ *F. culmorum* في الدفيئة باستخدام خمس سلالات بكتيرية، نتائج تحكم أفضل ضد العزلة FC1 بالمقارنة بالعزلة FC2، أي عكس ما تم الحصول عليه في الاختبار "in vitro"، ربما ترجع هذه النتائج إلى الاختلاف في الضدية تجاه العزلتين الفطريتين في البيئات المختلفة (في المخبر وفي الدفيئة). في الواقع، لتجنب التباين في المكافحة الحيوية لمسببات الأمراض، يجب علينا تطوير لقاحات تحتوي على خليط من سلالات بكتيرية مختلفة تمتلك نشاطية ضدية للفطريات أو من خلال اختيار سلالات بكتيرية تحفز المقاومة النظامية الذاتية في النباتات. أثبت Baffoni وآخرون (2015)، أن استخدام خليط من عزلتي *Bacillus amyloliquefaciens* و *Lactobacillus plantarum*، كعلاجات بيولوجية أسبوعية، كانت فعالة في تقليل أعراض مرض لفحة السنابل في القمح الصلب. قام كل من Jetiyanon و Fowler (2003) بتطبيق خليط من *B. Pumilus* و *B. amyloliquefaciens*، فأعطى نتائج جيدة في حماية القمح من *F. culmorum* عن طريق تخفيض طول منطقة الإصابة في الجذور.

عندما تم تطبيقها كطلاء للبذور، أظهرت السلالتين B. BB19، B. B16 تأثيراً ضدياً خاصاً تجاه العزلتين الفطريتين FC1 و FC2 على الترتيب، حيث أنها كانت قادرة على تخفيض شدة الإصابة بشكل ملحوظ، في كل من البذور والشتلات. ظهر هذا التأثير على شكل تحسن في الطول والوزن الطازج للنظامين الخضري والجذري مقارنة بالمجموعة الشاهدة. تعتبر هذه النتائج جيدة عند مقارنتها مع ما تحصلت عليه Mnasri وآخرون (2016)، حيث حصلوا على نسبة من تخفيض طول النظام الخضري والجذري بين 43.18 و 59.05% وبين 35.14 و 47.30% على الترتيب، وتحصلوا أيضاً على نسبة تخفيض في الوزن الطازج لكل من النظامين الخضري والجذري بين 75.26% و 79.47% وبين 37.5% و 49.17% على الترتيب باستخدام عزلتين من *F. culmorum*.

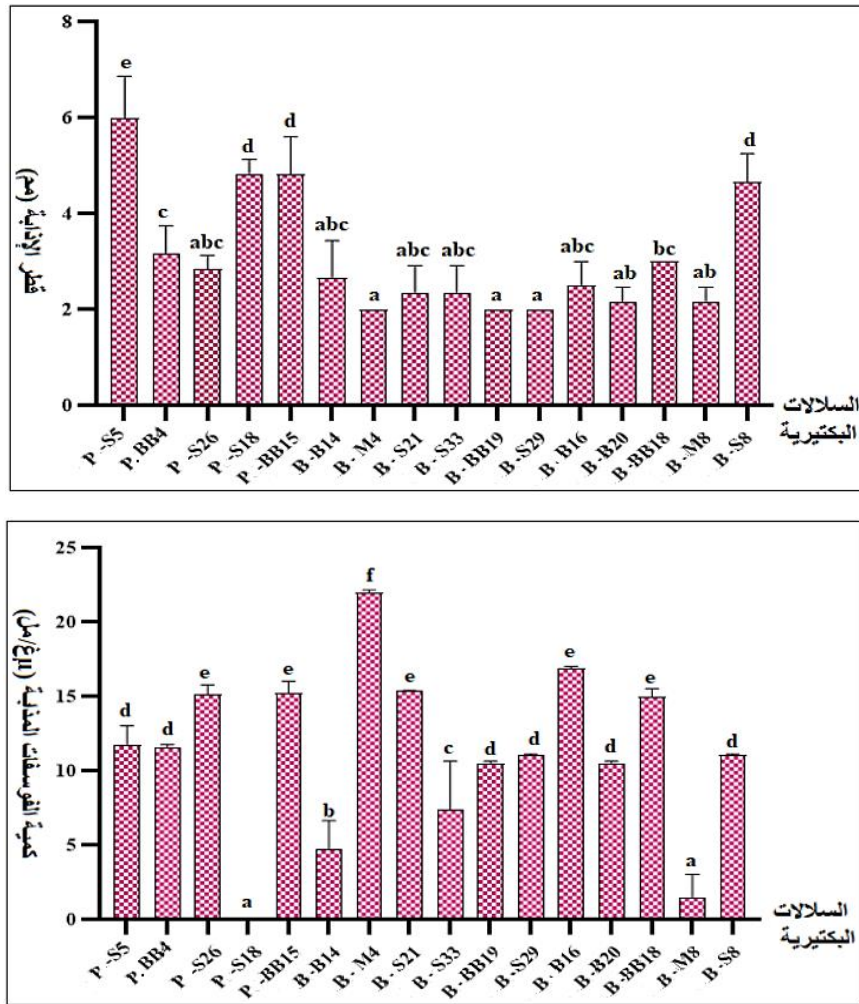
يمثل تطوير لقاح ذو نشاطية عدائية واسعة الطيف وذو نشاطية محسنة للنمو النباتي (PGP)، خياراً جيداً جداً لاستخدامه في كل من التحفيز الحيوي لنمو النبات والتحكم البيولوجي في مسببات الأمراض في محصول القمح الصلب. وعليه، قد يساعد هذا التطبيق على تقليل الاعتماد على المبيدات الكيميائية، مما يؤدي إلى نظام زراعي طبيعي مستدام.

9.3- فحص البكتيريا الجذرية من جهة نشاطها المعزز لنمو النباتي (PGP)

1.9.3- اذابة الفوسفات (Phosphate solubilisation)

تم اختبار 16 سلالة بكتيرية من أجل دراسة قدرتها على تحليل (اذابة) الفوسفات على الوسط الصلب NBRIP الذي يحتوي على الفوسفات ثلاثي الكالسيوم كمصدر وحيد للفوسفات. بعد عملية الحضانة (10 أيام/28 م°)، تبين أن جميع السلالات المختبرة تستطيع اذابة الفوسفات $[Ca_3(PO_4)_2]$ ، من خلال ظهور المنطقة الباهتة حول المستعمرات البكتيرية. اختلفت السلالات البكتيرية فيما بينها اختلافا معنويا بشكل كبير جدا ($P < 0.001$)، حيث تفاوتت الأقطار المسجلة من سلالة الى أخرى، لكنها كانت محصورة عموما بين 3 و 4.67 مم بالنسبة للأنواع التابعة لجنس *Bacillus*، ومحصورة بين 2.83 و 6 مم بالنسبة للأنواع التابعة لجنس *Pseudomonas*. من بين جميع البكتيريا المختبرة، أعطت السلالة P.S5 أكبر قطر اذابة للفوسفات مساو لـ 6 مم، بينما أعطت السلالات B. M4، B. BB19 و B. S29 أصغر قطر اذابة مساو لـ 2 مم لكل منها. تجدر الإشارة الى أن الأقطار المسجلة لم تتغير ابتداء من اليوم الخامس وبقية ثابتة حتى انهاء التجربة في اليوم العاشر (شكل II.15).

سمح الوسط السائل NBRIP بتقدير كمية الفوسفات المذابة. اختلفت السلالات البكتيرية فيما بينها اختلافا معنويا بشكل كبير جدا ($P < 0.001$)، حيث تفاوتت كمية الفوسفات المذابة من سلالة الى أخرى، إلا أن النتائج في هذه التجربة كانت مختلفة عن سابقتها في الوسط الصلب، حيث لوحظ أن بعض سلالات الـ *Bacillus* أعطت نتائج أفضل بكثير مقارنة بالوسط الصلب، حيث انتقلت السلالة B. M4 مثلا من أضعف سلالة (بتسجيل أصغر قطر اذابة على الوسط الصلب) الى أفضل سلالة بتسجيل أكبر كمية من الفوسفات المذابة قدرت بـ 22 µغ/مل. بقيت سلالات الـ *Pseudomonas* تقريبا على حالها، بالمقارنة بالنتائج على الوسط الصلب، بتسجيل كميات مقبولة من الفوسفات المذابة يمكن حصرها بين 11.56 (بالنسبة للسلالة P.BB4) و 15.19 µغ/مل (بالنسبة للسلالة P.BB15). سجل استثناء وحيد بالنسبة للسلالة P. S18 التي لم تسجل أي إذابة للفوسفات على الوسط السائل على الرغم من أنها فعلت ذلك على الوسط الصلب (شكل II.15).



شكل 15. II. إذابة الفوسفات من طرف السلالات البكتيرية. القيم المعطاة عبارة عن معدلات (n= 3) مع الانحراف المعياري. الأعمدة المؤشرة بنفس الحرف تعتبر غير مختلفة معنويًا عند $P < 0.05$ (اختبار Duncan للاختلافات المعنوية).

بإسقاط النتائج المتحصل عليها في هذا العنصر من الدراسة على النتائج المتحصل عليها في اختبار الضدية، في الدفيئة، نجد أن السلالات التي خفضت من الأضرار التي سببها المرض الفطري، كانت أيضا محللة لكمية مقبولة من الفوسفات، خصوصا السلالتين B.B16 و B.BB18. كما أن دراسة الارتباط (جدول 13. II) أظهرت وجود ارتباط عكسي قوي بين نسبة الفوسفات المحللة من طرف البكتيريا ونسبة تخفيض الطول لكل من النظامين الجذري والهوائي، والوزن الطازج للنظام الجذري. أي أنه كلما زادت نسبة الفوسفات المحللة نقصت نسبة تضرر كل من طول النظام الجذري والهوائي والوزن الطازج للنظام الجذري. تساعد هذه النتيجة

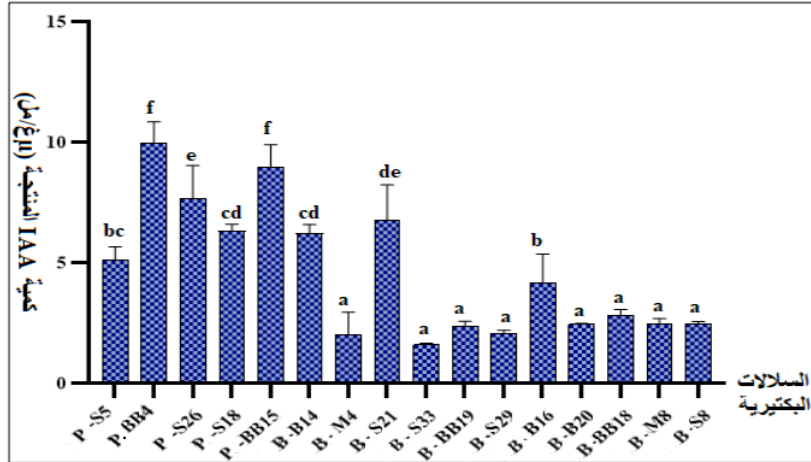
في تفسير تخفيض الأضرار الناتجة عن الممرض الفطري، وكذلك التحسن الملاحظ في كل من طول ووزن النظامين الجذري والهوائي في وجود هذه السلالات.

يعتبر الفوسفور عنصرا غذائيا رئيسيا، وهو مطلوب لنمو الحبوب، لكن أقل من 10% من فوسفور التربة يدخل في دورة النبات والحيوان (Chaiharn and Lumyong, 2010). تعتبر البكتيريا الجذرية القادرة على اذابة (تحليل) الفوسفات كعوامل تخصيب حيوية (Sharma et al., 2007). من بين أهم الأنواع التي تمتلك هذه الخاصية نجد أفراد الجنس *Bacillus* و *Pseudomonas* (Chaiharn and Lumyong, 2010).

أظهرت نتائج الدراسات الكمية والكيفية، أن جميع السلالات المختبرة كان بإمكانها اذابة الفوسفات، ماعدا السلالة P. S18 في الاختبار الكمي، ولكن بكميات مختلفة بين السلالات. لوحظ أن بعض السلالات أذابت الفوسفات في الوسط السائل أكثر منه في الصلب، يمكن أن يرجع هذا الى سهولة حركة المواد المتفاعلة في الوسط السائل بالمقارنة مع الوسط الصلب. يؤكد ذلك ما ذكره Nautiyal (1999)، أن الأحماض العضوية المفرزة من أجل اذابة الفوسفات (حمض الغلوكونيك، حمض اللين وحمض الخل وغيرها) تتحرك بصعوبة في الوسط الصلب مقارنة بالوسط السائل. تعتبر كمية الفوسفات المذابة المتحصل عليها قليلة جدا بالمقارنة مع ما تم الحصول عليه من طرف Arif وآخرين (2015)، الذين تحصلوا على كميات بين 50 و 188 $\mu\text{g/ml}$. وهي بالمقابل، ليست بعيدة عن التي تحصل عليها Chaiharn و Lumyong (2010)، حيث وجدا أن أكثر من 50% من البكتيريا المختبرة أعطت قيما أقل من 50 $\mu\text{g/ml}$.

2.9.3- إندول-3-حمض الخليك (IAA)

تم اختبار إنتاج IAA على الوسط LB + التريتوفان. أظهرت النتائج أن جميع السلالات المختبرة يمكنها إنتاج IAA ولكن بكميات مختلفة جدا، وهذا ما أكدته نتائج دراسة التباين ($P < 0.001$). تم إنتاج أكبر كمية من طرف السلالة P.BB4 وقد قدرت بـ 9.97 $\mu\text{g/ml}$ ، كما أظهر تحليل التباين الاختلاف المعنوي بينها وبين السلالات الأخرى ($P < 0.05$) ماعدا مع السلالة P.BB15. تم إنتاج أصغر كمية من طرف السلالة B. S33 وقد قدرت بـ 1.59 $\mu\text{g/ml}$ ، مع وجودها في نفس المجموعة الإحصائية مع كل من B. BB18، B. BB19، B. M4، B. S29، B. S8، B. M8 و B. B20. عموما، تميزت سلالات *Pseudomonas* بإنتاج كمية أكبر من IAA، بين 5.1 و 9.97 $\mu\text{g/ml}$ ، بالمقارنة سلالات *Bacillus* حيث كانت القيم بين 1.59 و 6.79 $\mu\text{g/ml}$ (شكل II.16).



شكل II.16. إنتاج IAA من طرف السلالات البكتيرية. القيم المعطاة عبارة عن معدلات (n=3) مع الانحراف المعياري. الأعمدة المؤشرة بنفس الحرف تعتبر غير مختلفة معنويًا عند $P < 0.05$ (اختبار Duncan للاختلافات المعنوية).

بإسقاط النتائج المتحصل عليها في هذا العنصر من الدراسة على النتائج المتحصل عليها في اختبار الضدية في الدفيئة، وعلى الرغم من الكميات الضئيلة المنتجة من طرف البكتيريا المدروسة في اختبار الضدية، إلا أن دراسة الارتباط (جدول II.13) أظهرت وجود ارتباط طردي قوي بين كمية IAA المنتجة وطول كل من النظامين الهوائي والجذري، وكذلك الوزن الطازج للنظام الجذري، أي أنه كلما زادت كمية IAA المنتجة، كلما زاد طول كل من النظامين الجذري والهوائي، وكذلك الوزن الطازج للنظام الجذري. وبالتالي نستطيع الاستنتاج أن IAA يساهم بشكل ملحوظ في تحسين نمو شتلات القمح.

تشارك الهرمونات النباتية، ومن بينها IAA، التي يتم بناؤها من طرف عدد كبير من البكتيريا الجذرية بشكل فعال في استطالة ونمو النباتات (Patten and Glick, 2002). بينت النتائج المتحصل عليها أن البكتيريا المختبرة كانت غير فعالة بشكل كبير في إنتاج هذه المادة حيث أن النتائج كانت أقل مما توصل إليه Ahmed وآخرون (2005)، الذين تحصلوا على إنتاج فاق $50 \mu\text{g/ml}$ باستعمال سلالات *Pseudomonas*. لكنها ليست بعيدة بكثير عما توصل إليه Lwin وآخرون (2012)، الذين تحصلوا على كميات بين 12.4 و $35.7 \mu\text{g/ml}$ باستعمال سلالات من الجنسين *Pseudomonas* و *Bacillus*. يتأثر إنتاج هذا الهرمون بوسط الزرع، إلا أنه عموماً يجب أن يحتوي على التريتوفان الذي يعتبر المادة الأولية التي يصنع منها هذا الهرمون، فقد تحصل Bharucha وآخرون (2013) على كميات معتبرة من IAA باستعمال سلالات من الجنس *Pseudomonas* في المرق المغذي (Nutrient Broth) مع إضافة كمية من التريتوفان بين 2 و 5 مغ/مل.

3.9.3- إنتاج الأمونيا

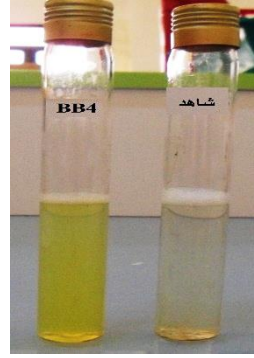
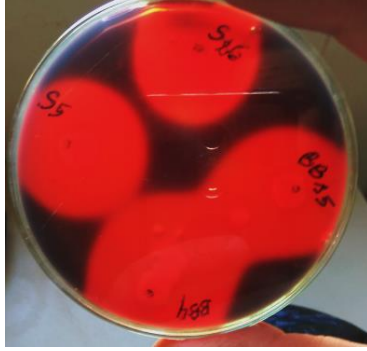
بعد حضن الماء الببتوني الملقح بمختلف السلالات البكتيرية، تم الكشف عن إنتاج الأمونيا بإضافة كاشف Nessler. يترجم ظهور اللون الأصفر- البرتقالي بإنتاج الأمونيا (شكل II.17.أ)، حيث ظهر أن كل السلالات البكتيرية المختبرة كانت منتجة لهذ المادة. تجدر الإشارة الى أن السلالة P.BB15 شكلت مستحلبا أصفرا بعد إضافة الكاشف، كما أن السلالة B. S21 شكلت راسبا أصفرا مع تعكر شديد للوسط. يعتبر إنتاج الأمونيا خاصية مهمة عند البكتريا الجذرية، لأنها تحسن نمو النبات بشكل غير مباشر (Karuppiyah and Rajaram, 2011) كما تضمن دورا في الإشارات أثناء التفاعل بين البكتيريا الجذرية والنبات (Becker *et al.*, 2002). من المعروف أن الأمونيا التي تطلقها البكتيريا تسرع نشاط أنزيم "Glutamine synthetase". بالإضافة إلى ذلك، يُعتقد أن ناقلات الأمونيوم الموجودة في العديد من البكتيريا الجذرية المعززة للنمو النباتي، تشارك في إعادة امتصاص NH_4^+ الذي تم إطلاقه نتيجة لانتشار NH_3 من خلال الغشاء البكتيري (Parvaze and Onukwue, 2014).

4.9.3- إنتاج حاملات الحديد

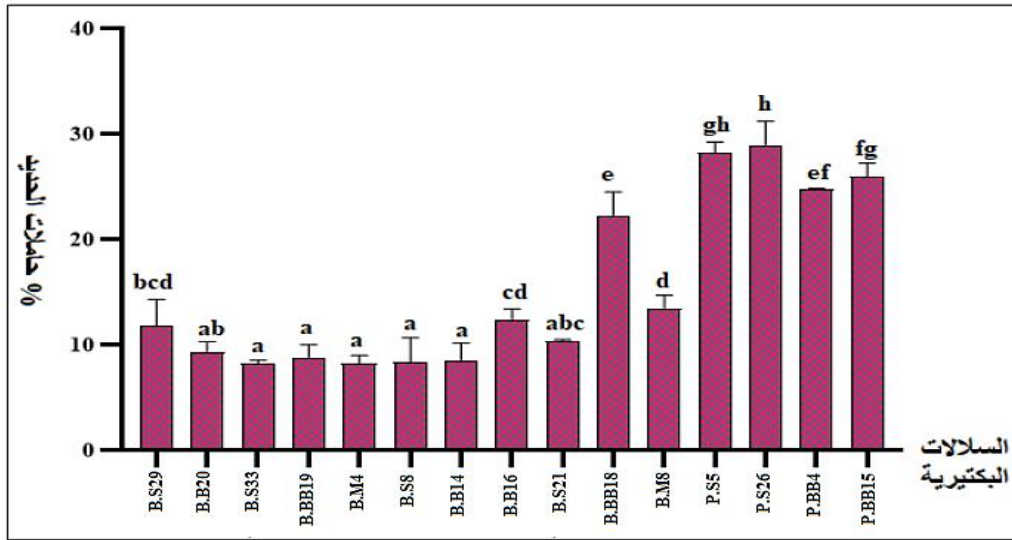
على الوسط الصلب CAS، أنتجت جميع السلالات التابعة للجنس *Pseudomonas* كميات معتبرة من حاملات الحديد، يظهر هذا الإنتاج من خلال تشكل الهالات البرتقالية حول المستعمرات (شكل II.17.ب). اختلفت معدلات أقطار الهالات قليلا لكنها كانت بين 21.5 مم، بالنسبة للسلالة P.S26 و 29.5 مم، بالنسبة للسلالة P.BB4، وهو أيضا أكبر قطر بين جميع البكتيريا المختبرة. بالنسبة للسلالات التابعة للجنس *Bacillus*، فقد كانت الاختبارات كلها سلبية بعد 24 ساعة من الكشف، إلا أن جميع السلالات أظهرت هالات صغيرة مع مرور الأيام (بين 5 و 10 أيام)، تراوح معدل قطرها بين 4.25 مم، بالنسبة للسلالة B. M4 و 14.75 مم بالنسبة للسلالة B. M8.

على الوسط السائل، تم الحصول على قيم دقيقة لكميات حاملات الحديد المنتجة من طرف البكتيريا. بعد الحضن، يتغير لون المزيج، المحتوي على الجزء الطافي للبكتيريا مع الوسط السائل CAS، الى البرتقالي حسب كمية حاملات الحديد المنتجة. عموما، لم تتغير النتائج بالنسبة للسلالات التابعة للجنس *Pseudomonas* حيث أنتجت كلها كميات معتبرة من حاملات الحديد، تراوحت نسب الإنتاج، لهذه السلالات، بين 24.7% (بالنسبة لـ P.BB4) و 28.95% (بالنسبة لـ P.S26)، وهي تعد هذه الأخيرة، أكبر نسبة تم الحصول عليها، كما أن دراسة التباين أظهرت أنها تختلف معنويا ($P < 0.001$) مع جميع السلالات المختبرة. بالنسبة للسلالات التابعة

للنوع *Bacillus*، فقد أنتجت نسبا متفاوتة من حاملات الحديد تراوحت بين 8.25% (بالنسبة لكل من B. S33 و B. S8) و 22.29% (بالنسبة لـ B. BB18) وهي تعد أكبر نسبة فيما يخص هذه المجموعة. تؤكد هذه النتيجة ما تم التوصل اليه على الوسط الصلب، وهو أن سلالات الجنس *Bacillus* أيضا يمكنها انتاج حاملات الحديد لكن الكشف عنها على الوسط الصلب قد يستغرق وقتا أطول (شكل 18.II).



شكل 18.II. نتائج اختبارات الكشف عن: الى اليمين، الكشف عن انتاج الأمونيا. الى اليسار، الكشف عن انتاج حاملات الحديد من طرف السلالات البكتيرية المختبرة.



شكل 18.II. النسب المئوية لانتاج حاملات الحديد من طرف السلالات البكتيرية. القيم المعطاة عبارة عن معدلات (n= 3) مع الانحراف المعياري. الأعمدة المؤشرة بنفس الحرف تعتبر غير مختلفة معنويًا عند $P < 0.05$ (اختبار Duncan للاختلافات المعنوية).

بإسقاط النتائج المتحصل عليها في هذا العنصر من الدراسة على النتائج المتحصل عليها في اختبار الضدية في الدفينة، وجد أن السلالات التي خفضت من الأضرار التي سببها الممرض الفطري، كانت أيضا منتجة لكمية مقبولة من حاملات الحديد، خصوصا السلالتين B.B16 و B.BB18. كما أن دراسة الارتباط (جدول II. 13) أظهرت وجود ارتباط عكسي قوي بين نسبة حاملات الحديد المنتجة من طرف البكتيريا ونسبة تخفيض كل من طول النظام الهوائي والوزن الطازج للنظامين الجذري والهوائي. أي أنه كلما زادت نسبة حاملات الحديد المنتجة نقصت نسبة تضرر كل من طول النظام الهوائي والوزن الطازج للنظامين الجذري والهوائي. تساعد هذه النتيجة في تفسير تخفيض الأضرار الناتجة عن الممرض الفطري، وكذلك التحسين الملاحظ في مظاهر النمو (الطول والوزن الطازج) في وجود هذه السلالات.

يؤثر إنتاج حاملات الحديد إيجابيا على نمو النبات، عن طريق تثبيت الحديد في شكله المتاح " Fe_3^+ " في المحيط الجذري فيكون بذلك محفزا للنمو النباتي (Whipps, 2001). من خلال هذه الوظيفة، توفر حاملات الحديد الحماية للنباتات ضد العديد من الأمراض الفطرية أو البكتيرية (Siddiqui, 2006).

يدل ظهور الهالة البرتقالية، حول المستعمرة على الوسط الصلب الأزرق، إلى انتقال أيونات الحديد (Fe^{+3}) من CAS إلى حاملات الحديد (Schwyn and Neilands, 1987). يعتبر الوسط KB، الخالي من الحديد، وسطا ملائما للكشف عن إنتاج حاملات الحديد من طرف البكتيريا الجذرية. على العكس من ذلك، توصل Johri و Sharma (2003) إلى أن الإنتاج يكون ضعيفا باستعمال الأوساط السائلة KB، Trypticase-Soja و NB، وقد خلصا إلى أن الأوساط الاصطناعية أفضل من الأوساط المعقدة من أجل اجتناب إضافة الحديد من مكونات الوسط، كما خلصا إلى أن معدل إنتاج حاملات الحديد يتأثر بمصدر الكربون، الأغذية الضرورية أو الدقيقة (oligo-elements) والقدرة على المحافظة على pH الوسط. بصفة عامة أظهرت النتائج تفوق سلالات *Pseudomonas* على سلالات *Bacillus* في إنتاج هذه الجزيئة. تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه Gupta و Gopal (2008)، اللذان وجدا أن أنواع الـ *Pseudomonas* هي الأكثر إنتاجا لهذه الجزيئات من بين البكتيريا المعزولة بتسجيل أقطار بين 15 و 26 مم، كما وجدا أن سلالات *Bacillus* لم تنتج حاملات الحديد على الوسط الصلب. على العكس من ذلك، تعتبر النتائج المسجلة أفضل مما توصلوا إليه في الوسط السائل، خصوصا مع سلالات *Bacillus*، حيث لم يسجلا أي إنتاج معها. أما مع سلالات *Pseudomonas* فقد سجلا نسبا أفضل (بين 51 و 76%) من النسب المسجلة في دراستنا. يمكن أن يرجع الفرق في الإنتاج إلى الفرق بين الأنواع، الإرث الجيني (المادة الوراثية) ومصدره. قد تؤثر العوامل البيئية أيضا على إنتاج حاملات الحديد عند أنواع *Pseudomonas* (Sharma and Johri, 2003). تعرف سلالات *Pseudomonas* المفلورة بإنتاجها لحاملات

الحديد، مثل pseudobactines و pyoverdines المسؤولين على اللون الأصفر المخضر وعلى الفلورة تحت اشعة UV (Sharma and Johri, 2003). نظرا لشراحتها الكبيرة لشوارد الحديد، تلتقط حاملات الحديد ما يوجد في محيطها من الحديد، وتجعله غير قابل للاستعمال من طرف الكائنات الدقيقة الممرضة للنبات الموجودة في المحيط الجذري (Sreedevi et al., 2014). كما أن بإمكانها تثبيط انبات الكونيديات لعدة أنواع فطرية، من بينها الـ *Fusarium* (Sindhu et al., 2009).

جدول 13. II. دراسة الارتباط (Pearson's Correlation) بين السلالات البكتيرية (الأفضل في اختبار الضدية في الدفيئة) وبين نسب انتاج كل من حاملات الحديد، IAA وتحليل الفوسفات.

Parameters	VSL_Red	RSL_Red	FWVS_Red	FWRS_Red	Siderophore	Phoph_Solubil	IAA
VSL_Red	1						
RSL_Red	0,842**	1					
FWVS_Red	0,702**	0,538**	1				
FWRS_Red	0,700**	0,758**	0,527**	1			
Siderophore	-0,439*	-0,245	-0,542**	-0,598**	1		
Phoph_Solubil	-0,433*	-0,662**	-0,194	-0,409*	-0,169	1	
IAA	0,411*	0,581**	0,361	0,551**	-0,470**	-0,485**	1

** The correlation is significant at the 0.01 level (bilateral). * The correlation is significant at the 0.05 level (bilateral).

VSL: Vegetative system length. **RSL:** Root system length. **FWVS:** Fresh weight vegetative system. **FWRS:** Fresh weight Root system. **Red:** Reduction.

5.9.3- تثبيت الأزوت الجوي

بعد عملية الحضان لمدة 48 ساعة على درجة حرارة 30 م° على الوسط WS، تبين أن جميع السلالات المختبرة يمكنها النمو على هذا الوسط، أي أنها قادرة جميعا على تثبيت الأزوت الجوي. تعتبر خاصية تثبيت الأزوت خاصية مهمة ذات تأثير مباشر على النمو النباتي. تعتبر هذه الخاصية، واحدة من الآليات الرئيسية التي يستفيد من خلالها النبات من الارتباط مع الميكروبات. توفر البكتيريا الجذرية للنباتات النيتروجين المثبت مقابل حصولها على الكربون المنطلق على شكل إفرازات جذرية. ترتبط هذه النشاطية بوجود المورثة "nif H" وهي موجودة عند كل البكتيريا سالبة الجرام. ومع ذلك، فإن 50% فقط من سلالات *Bacillus* قادرة على تثبيت الأزوت الجوي (Cherif, 2014). توجد عدة تقارير حول تطبيق البكتيريا المثبتة للأزوت، بما في ذلك *Bacillus spp*، لزيادة غلة المحاصيل المختلفة (Ding et al., 2005).

4-خاتمة

كشفت هذه الدراسة عن وجود أنواع مختلفة من البكتيريا الجذرية، المضادة للفطريات المسببة للأمراض، التي تعمر جذور الحبوب المختلفة، مع هيمنة جنس *Bacillus*. كانت جميع البكتيريا الجذرية قادرة على الحد من النمو الشعاعي للميسيليوم الفطري، وإنبات الكونيديات لكل من *F. culmorum* و *F. chlamydosporum*. من المحتمل أن يرجع التأثير التثبيطي لهذه البكتيريا إلى إنتاج المركبات الطيارة المضادة للفطريات من ناحية، ومن ناحية أخرى إلى إنتاج الإنزيمات المفككة للجدار الخلوي الفطري. أظهرت نتائج النشاط المضاد تجاه الفطريات الممرضة، أن جذور الحبوب تأوي العديد من البكتيريا ذات الإمكانيات الجيدة في مكافحة الحيوية لمسببات الأمراض النباتية.

أدى تغليف بذور القمح الصلب، باستخدام خمس سلالات بكتيرية، ثم تلويثها (إصابتها) باستخدام عزلتين من *F. culmorum*، إلى تحسين الطول والوزن الطازج لكل من غمد الريشة والجذور وخفض النسبة المئوية لمظاهر إصابة البذور التي سببتها عزلتي الـ *F. culmorum* المستخدمة. تأثرت فعالية مكافحة الحيوية لـ *F. culmorum* في الدفيئة، بعدوانية السلالة الفطرية المستخدمة وكذلك خصوصية التفاعل المضاد بين السلالات البكتيرية والفطرية.

نظرا لخصائصها المضادة والمحسنة للنمو النباتي، استطاعت السلالات B. BB19 و B. B16، B. S8، تخفيض مظاهر إصابة شتلات القمح بعزلات *F. culmorum* المختبرة. من أجل ذلك يمكن استخدامها في خليط كعوامل حيوية مغلفة لبذور القمح، من أجل مكافحة الأمراض النباتية الناتجة عن أفراد الـ *Fusarium* ومن أجل تحفيز النمو النباتي لدى نبات القمح.

سمح فحص البكتيريا الجذرية من جهة نشاطها المعزز لنمو النباتي، بإظهار فعالية السلالات التابعة للجنس *Pseudomonas* التي كانت في جميع الاختبارات الكمية أفضل بكثير من السلالات التابعة للجنس *Bacillus*. يمكن استغلال هذه الخاصية في استحداث مزيج مكون من سلالتين أو أكثر من كلا الجنسين بما أن سلالات *Bacillus* كانت الأفضل في مجال مكافحة البيولوجية، وأن سلالات *Pseudomonas* كانت الأفضل في مجال تعزيز النمو النباتي.

خاتمة عامة وآفاق البحث

توصلت الكثير من الدراسات الى أن بذور القمح، التي تعتبر غذاء هاماً لكثير من الشعوب عامة والشعب الجزائري خاصة، قد تحتوي على كثير من الفطريات الداخلية، يكون بعض هذه الفطريات مصدراً لخطر كبير على المستوى الاقتصادي والصحي على حد سواء. تم من خلال هذا البحث تأكيد هذه المعلومة، حيث عثر على أن أكثر من 50% من الحبوب المختبرة تحتوي على فطريات داخلية من أنواع مختلفة، لكن نسبة قليلة منها تحتوي على أحد الفطريات الممرضة، وهو الـ *Fusarium*. من بين 59 عينة قمح مختبرة، وجد أن 12 عينة منها احتوت عزلات الـ *Fusarium*. موزعة على خمس ولايات من الشمال الشرقي الجزائري. من بين أصناف القمح السبعة المختبرة، وجد أن أربعة منها فقط كانت مصابة بالـ *Fusarium*، كما أن الصنف GTAdur كان الأكثر احتواءً على عزلات الـ *Fusarium* بنسبة 43%، متبوعاً بالصنفين Vitron وبوسلام بنسبة 21% و22% على الترتيب، ثم الصنف واحد بنسبة 14%.

مكن التشخيص المظهري والمجهري للعزلات الفطرية الـ 14 المعزولة، من تحديد الأنواع التي تنتمي إليها، وهي خمس عزلات من النوع *F. acuminatum*، ثلاث عزلات من كل من النوعين *F. solani* و *F. equiseti*، عزلتين من النوع *F. culmorum* وعزلة واحدة من النوع *F. chlamydosporum*. تم تأكيد نتائج التشخيص المظهري لخمس عزلات عن طريق التعريف الجزيئي، باستعمال نوع واحد أو نوعين من البادئات حسب الحاجة، وقد تم ادماج التسلسلات المتحصل عليها في بنك المورثات "Genbank" ومن ثم الحصول على أرقام الدخول لكل منها.

تتأثر العزلات الفطرية المختلفة، تأثيراً كبيراً، بالعوامل الفيزيوكيميائية، حيث أظهرت النتائج أن نمو الميسيليوم يتأثر بدرجة حرارة الحضانة، لكن العزلات الفطرية عموماً تفضل درجات الحرارة المعتدلة (بين 22 و25 م°)، كما أن نمو الميسيليوم وإنتاج الأبواغ يتأثر بطبيعة وسط الزرع، حيث يساعد الوسط الغني بالمغذيات (PSA) على النمو الكثيف مع إنتاج قليل نسبياً للأبواغ، عكس الوسط الفقير من المغذيات (SNA).

اختلفت امراضية العزلات، المتحصل عليها، لبذور وشتلات القمح، لكن هذا الاختبار مكن من معرفة أكثر العزلات خطورة وهي خصوصاً الممثلة للنوعين *F. culmorum* و *F. chlamydosporum*. أما بالنسبة للأنواع الأخرى (*F. acuminatum*، *F. equiseti* و *F. solani*) فقد كانت امراضية العزلات المنتمية إليها متفاوتة بين المتوسطة والضعيفة عموماً. من جهة أخرى، أظهرت أصناف القمح المختبرة حساسية مختلفة تجاه العزلات الفطرية، لكنها كانت متغيرة من اختبار إلى آخر.

تبقى مشكلة القضاء على الأمراض الناتجة عن هذه الأنواع الفطرية قائمة، بسبب عدم وجود حلول فعالة للقضاء عليها، خاصة في الجزائر. مكنت هذه الدراسة من الوصول الى أحد الحلول التي يجري تطبيقها في كثير من المناطق في العالم، وهي استعمال السلالات البكتيرية، خاصة من منطقة المحيط الجذري، ذات الضدية القوية تجاه أنواع الـ *Fusarium*، في مكافحة الأمراض الفطرية.

تم اختبار 188 سلالة بكتيرية، تم عزلها من 4 ولايات من الشمال الشرقي الجزائري، من بين هذه الأخيرة تم اختيار 16 سلالة (5 سلالات من الجنس *Pseudomonas* و11 من الجنس *Bacillus*) أبدت نشاطية ضد فطرية مقبولة، متمثلة في تثبيط نمو الميسيليوم الفطري، في كل من اختبائي المواجهة المباشرة وغير المباشرة. من بين 16 سلالة مختبرة أظهرت السلالات الخمس الأقوى فعالية عالية جدا فاقت 80%، في تثبيط انبات الكونيديات للعزلات الفطرية الأكثر عدائية في اختبار الإراضية.

من بين السلالات الخمس الأقوى، استطاعت أربع سلالات فقط وقاية كل من غمد الريشة والجذور من حيث الطول وعدد الفروع، حيث خفضت من الأضرار التي تسببها عزلتي النوع *F. culmorum*. بينما استطاعت ثلاث سلالات فقط، تخفيض الأضرار المسببة من طرف نفس عزلتي الفطر، لكل من الطول والوزن الطازج للنظامين الجذري والهوائي.

يمكن تفسير ضدية البكتيرية تجاه الفطريات الممرضة بعدة أمور من بينها إنتاج الأنزيمات المحللة التي تعمل على هدم الجدار الخلوي للفطر الممرض، وكذلك من خلال تحسين النمو النباتي، ومنه تقوية الدفاع الذاتي لديها. أظهرت النتائج وجود ارتباط قوي بين النشاطية الضدية للبكتيريا وإنتاج الأنزيمات المحللة من حيث الكم والكيف. اما من جهة تحسين النمو النباتي، فقد وجد أن الأنواع الأكثر ضدية للفطريات لم تكن فعالة، الى حد ما، في تحسين النمو النباتي. على العكس من ذلك، أظهرت سلالات الجنس *Pseudomonas* نتائج أفضل فيما يخص تحسين النمو النباتي على الرغم من أن ضديتها تجاه الفطريات لم تكن قوية الى حد ما.

تم في نهاية الدراسة تعريف السلالات الخمس الأفضل، باستعمال تقنيات البيولوجيا الجزيئية، وقد تم ادماج التسلسلات المتحصل عليها في بنك المورثات "Genbank" ومن ثم الحصول على أرقام الدخول لكل منها.

تبقى هذه الدراسة غير كاملة، بطبيعة الحال، وتحتاج الى بعض التكميلات والاختبارات التي يمكن اجراؤها في وقت لاحق. يمكن اجراء اختبارات أخرى من أجل التأكيد على فعالية السلالات خاصة منها المتعلقة بالنشاطات الأنزيمية.

بما أن نتائج هذه الدراسة كانت مرضية جدا، خصوصا من ناحية الضدية تجاه الفطريات وتخفيض تأثيرها السلبي على بذور وشتلات القمح، فانه من المناسب جدا الانتقال الى تطبيق هذه السلالات على أرض الواقع،

اما على شكل طلاء للبذور أو بإضافتها الى التربة، من خلال مزارع تجريبية حقلية من أجل الوصول الى نتائج حقيقة، لأن التجارب المجراة لم تستطع تفسير جميع التفاعلات الحاصلة بين البكتيرية الضدية والفطريات الممرضة من جهة، والتحسينات المتحصل عليها من جهة أخرى.

انطلاقا من نتائج تقنية التغليف الحيوي للبذور، يمكن في دراسات لاحقة، استحداث مزيج بكتيري مكون من السلالات الأفضل من كلا النوعين *Bacillus* و *Pseudomonas* واستعماله في تغليف بذور القمح (تحضيرها لعملية الزرع) بدل المبيدات الفطرية ذات الأضرار المعروفة، من أجل وقايتها من الممرضات الفطرية، عن طريق سلالة *Bacillus* من جهة، وكذلك تحسين نموها في المراحل الموالية لعملية الإنبات عن طريق سلالة *Pseudomonas*.

قائمة المراجع

محمد، م.ك. 2000. زراعة القمح. مؤسسة المعارف للطباعة والنشر. ص 272.

- Abdallah-Nekache, N., Laraba, I., Ducos, C., Barreau, C., Bouznad, Z. & Boureghda, H. 2019. Occurrence of *Fusarium* head blight and *Fusarium* crown rot in Algerian wheat: identification of associated species and assessment of aggressiveness. *Eur J Plant Pathol*, 154 : 499–512.
- Abed H. 2017. Dépistage et utilisation des rhizobactéries antagonistes (*Pseudomonas* et *Bacillus*) dans la lutte biologique contre la fusariose du pois chiche induite par *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Setifl. Discipline : Biologie. Spécialité : Microbiologie, pp :40-45.
- Abis, S. 2012. Le blé en Méditerranée sociétés, commerce et stratégies. Économie et territoire relations commerciales CIHEAM Paris, 241-247.
- Achouak, W., Conrod, S., Cohen, V. & Heulin, T. 2004. Phenotypic variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a plant root-colonization strategy. *Mol Plant Microbe Interact*, 17: 872-879.
- Agarwal, M., Dheeman, S., Chand Dubey, R., Kumar, P., Kumar, M.D. & Bajpai, V.K. 2017. Differential Antagonistic Responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* Causing Fungal Diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench. *Microbiol Res*, 205: 10.
- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Fifth edition, Elsevier Academic Press, San Diego, CA 962 p.
- Ahimou, F. Jacques, P., Deleu, M. (2000). Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 749– 754.
- Ahmad F, I. Ahmad et M. S. Khan. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.*, 29: 29- 34.
- Ahmad, F., Ahmad, I. & Khan, M.S. 2008. Screening of free-living rhizobacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res*, 163:173-181.
- Akinrinlola, R., Yuen, G., Drijber, R. & Adesemoye, T. 2018. Evaluation of *Bacillus* Strains for Plant Growth Promotion and Predictability of Efficacy by In Vitro Physiological Traits. *Int J Microbiol*, 1-11.
- Aleandri, M.P., Magro, P. & Chilosi, G. 2007. Modulation of host pH during the wheat *Fusarium culmorum* interaction and its influence on the production and activity of pectolytic enzymes. *Plant Pathol*, 56: 517-525.
- Alvarez, C.L., Azcarate, M.P. & Pinto, V.F. 2009. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates from wheat in Argentina. *Int J Food Microbiol*, 135(2) : 131–135.

- Ammar, M. 2014. Organisation de la chaîne logistique dans la filière céréales en Algérie états des lieux et perspective. Thèse de doctorat de CIHEAM, Institut Agronomique méditerranéen de Montpellier, 127p.
- Andreolli, M., Zapparoli, G., Angelini, E., Lucchetta, G., Lampis, S. & Vallini, G. 2019. *Pseudomonas protegens* MP12: A plant growth-promoting endophytic bacterium with broad-spectrum antifungal activity against grapevine phytopathogens. *Microbiol Research*, 219, 123-131.
- Andriani, D. & Park, D.H. 2010. Screening and Optimization of Cellulase Production of *Bacillus subtilis* TD6 Isolated from *Takifugu rubripes* Fish. *Ann Bogor*, 14 (1) :31-37.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H. & Oyaizu, H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol*, 4: 1563-1589.
- Aouali, S. & Douici-Khalfi, A. 2009. Recueil des principales maladies fongiques des céréales en Algérie : symptômes, développement et moyens de lutte ; ITGC, EL Harrach, Alger. 56p.
- Arfaoui, B., Sifi, A., Boudabous, I., El Hadrami, M. & Chérif. 2006. Identification of rhizobium isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris*, the causal agent of *Fusarium* wilt of chickpea. *J plant prot*, 88: 832.
- Argyris, J., TeKrony, D., Hershman, D., VanSanford, D., Hall, M., Kennedy, B., Rucker, M. & Edge, C. 2005. *Fusarium* head blight infection following point inoculation in the greenhouse compared with movement of *Fusarium graminearum* in seed and floral components. *Crop Sci*, 45: 626–634.
- Arif, F., Silini, A., Cherif-Silini, H. & Ghoul, M. 2015. Plant growth promoting and antagonistic traits of indigenous *fluorescent pseudomonas* spp. isolated from wheat rhizosphere and a *halimus endosphere*. *Eur Sci J*, 11:24.
- Arnold, D.L. & Preston, G.M. 2019. "*Pseudomonas syringae*: enterprising epiphyte and stealthy parasite". *Microbiology*, 165: 251–253.
- Arsan, M.R. & Eraky Amal, M.I. 2011. Aggressiveness of certain *Fusarium graminearum* isolates on wheat seedlings and relation with their trichothecene production. *Plant Pathol*, 10(1): 36-41.
- Audenaert, K., Van Broeck, R., Bekaert, B., De Witte, F., Heremans, B., Messens, K., Höfte M. & Haesaert, G. 2009. *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *Eur J Plant Pathol*, 125: 445–458.
- Backhouse, D., Abubakar, A., Burgess, L., Dennis, J. I., Hollaway, G. J., Wildermuth, G. B. & Henry, F. J. 2004. Survey of *Fusarium* species associated with crown rot of wheat and barley in eastern Australia. *Australas Plant Path*, 33(2):255–261.
- Baffoni, L., Gaggia, F., Dalanaj, N., Prodi, A., Nipoti, P., Pisi, A., Biavati, B & Di Gioia, D. 2015. Microbial inoculants for the biocontrol of *Fusarium* spp. in durum wheat. *BMC Microbiol*, 15: 242.
- Bai, G. H. & Shaner, G. E. 1994. Scab of wheat: prospects for control. *Plant Dis*, 78,760 –766.
- Bais, H.P. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. *Plant physiol*, 134(1): 307–319.

- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. & Vivanco, J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 233-66.
- Bakker A. W. & Schippers, P. 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol Biochem*, 19: 451- 457.
- Balmas, V., Scherm, B., Marcello, A., Beyer, M., Hoffmann, L., Migheli, Q. & Pasquali, M. 2015. *Fusarium* species and chemotypes associated with *Fusarium* head blight and *Fusarium* root rot on wheat in Sardinia. *Plant Pathol*, 64: 972–979.
- Baron S., Albrecht, T., Jeffrey, W., Almond, S. & Michelle J.A. 1996. *Bacillus*. In: *Barron's Medical Microbiology* (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. ISBN 978-0-9631172-1-2.
- Beccari, G., Prodi, A., Pisi, A., Nipoti, P., Onofri, A., Nicholson, P., Pfohl, K., Karlovsky, P., Gardiner, D. M., & Covarelli, L. 2018. Development of three *Fusarium* crown rot causal agents and systemic translocation of deoxynivalenol following stem base infection of soft wheat. *Plant Pathol*, 67: 1055 –1065.
- Becker, D., Stanke, R., Fendrik, I., Frommer, W.B., Vanderleyden, J., Kaiser, W.M. & Hedrich, R. 2002. Expression of the NH₄⁺ -transporter gene LEAMT1;2 is induced in tomato roots upon association with N₂- fixing bacteria. *Planta*, 215: 424-429.
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Meyer, J-M & Spröer, C. 2007. *Pseudomonas lurida* sp. nov., a fluorescent species associated with the phyllosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (5): 979-985.
- Bessaoud, O. 2018. L'Algérie et le marché des céréales. Académie d'agriculture de France. 104(2): 1-26.
- Bharucha, U., Kamlesh, P. & Trivedi, U.B. 2013. Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). *Agric. Res.*, 3: 215–221.
- Bhavya, M.I & Hebbar, U. 2017. Pulsed light processing of foods for microbial safety. *Food Quality and Safety*. 1. 10.
- Bomford, M. & Sinclair, R. 2002. Australian research on bird pests: impact, management and future directions. *Emu*, 102: 29-45.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Common wealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, p 237.
- Borriss, R., Chen, X.H., Rueckert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B., Fan, B., Pukall, R., Schumann, P., Sproer, C., Junge, H., Vater, J., Puhler, A. & Klenk, H.P. 2011. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 61 (8): 1786–1801.
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. & Gardan, L. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 51-63.
- Bottalico, A. & Perrone, G. 2002. Toxinogenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small grains cereals in Europe, *Eur J Plant Pathol*, 108: 667-673.

- Botton, R., Breton, A., Fevre, M., Guy, P.H., Larpent, J.P. & Veau P.1985. Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Biotechnologies. Masson, p139 à 145.
- Bouassida, M., Fourati, N., Ghazala, I., Ellouze-Chaabouni, S. & Ghribi, D. 2018. Potential application of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactants in laundry detergent formulations: Compatibility study with detergent ingredients and washing performance. *Eng. Life Sci*, 18: 70-77.
- Bouchet P., Guignard J.L. & Villard J. 2000. Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. Abrégés. Edition Masson p77.
- Boutigny, A.L., Ward, T.J., Van Coller, G.J. & Viljoen, A. 2011. Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. *Fungal Genet Biol*, 48(9):914–920.
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Garrity, G.M. & Staley, J.T. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume two*. New York: Springer.
- Brown, N.A., Urban, M., Van De Meene, A.M.L., Hammond-Kosack, K.E. 2010. The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonization in wheat spikes. *Fungal biol*, 114: 555-571.
- Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M.I., Gómez-Lama, C.C. & Mercado-Blanco, J. 2019. Biological Control Agents Against *Fusarium* Wilt of Banana. *Front Microbiol*, 10: 616.
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K. P. & Backhouse, D. 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research, 3rd edn. Sydney, Australia, University of Sydney and Botanical Garden, pp 133.
- Burlakoti, R. R., Estrada, R.J., Rivera, V.V., Boddada, A., Secor, G.A. & Adhikari, T.B. 2007. Real-time PCR quantification and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* in wheat inoculated with isolates collected from potato, sugar beet, and wheat. *Phytopathology*, 97: 835- 841.
- Cai, X.C., Liu, C.H., Wang, B.T. & Xue, Y.R. 2017. Genomic and metabolic traits endow *Bacillus velezensis* CC09 with a potential biocontrol agent in control of wheat powdery mildew disease. *Microbiol Res*, 196: 89-94.
- Cappuccino, J.G. & Sherman, N. 1992. Biochemical activities of microorganisms. *In: Microbiology, A Laboratory Manual*, third Ed. The Benjamin / Cummings Pub. Co., pp. 125–179. California, USA.
- Carbone, I. & Kohn, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553-556.
- Caron, D. 1993. Les Fusarioses. Dans *Maladies des blés et orges* : ITCF, ed., 30-39.
- Chaiharn, M. & Lumyong, S. 2010. Screening and Optimization of Indole-3-Acetic Acid Production and Phosphate Solubilization from Rhizobacteria Aimed at Improving Plant Growth. *Curr Microbiol*, 62(1): 173–181.
- Champeil, A., Doré, T. & Fourbet, J.F. 2004. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science* 166, 1389-1415.
- Charvet, JP, « Blé », *Encyclopaedia Universalis* (en ligne), Consulté le 10 octobre 2019. URL: <http://www.universalis.fr/encyclopedie/ble/>

- Chehri, K., Maghsoudlou, E., Asemani, M. & Mirzaei, M.R. 2011. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with head blight of wheat in Iran. *Paki J Bot*, 43.
- Chekali, S., Gargouri, S., Berraies, S., Nicol, M. J. & Nasraoui, B. 2013. Impact of *Fusarium* foot and root rot on yield of cereals in Tunisia. *Tunis J Plant Prot*, 8: 75–86.
- Chekali, S., Gargouri, S., Paulitz, T., Nicol, J. M., Rezgüi, M. & Nasraoui, B. 2011. Effects of *Fusarium culmorum* and water stress on durum wheat in Tunisia. *Crop Protection*, 30(6): 718–725.
- Cherif, H. 2014. Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. Thèse : pour obtenir le diplôme d'état de docteur en microbiologie. Univ-Setif-1.
- Chhokar, R.S., Sharma, R., Gopal., Kumar, A. & Gathala, M. 2007. Effect of tillage and herbicides on weeds and productivity of wheat under rice-wheat growing system. *Crop Prot*, 26: 1689-1696.
- Cho, S.M., Kang, B.R. & Kim, Y.C. 2013. Transcriptome Analysis of Induced Systemic Drought Tolerance Elicited by *Pseudomonas chlororaphis* O6 in *Arabidopsis thaliana*. *plant pathol j*, 29(2): 209–220.
- Christ, D.S., Gödecke, R., von Tiedemann, A. & Varrelmann, M. 2011. Pathogenicity, symptom development, and mycotoxin formation in wheat by *Fusarium* species frequently isolated from sugar beet. *Phytopathology*, 101: 1338-1345.
- Clays-Josserand, A., Lemanceau, P., Philippot, L. & Lensi, R. 1995. Influence of two plant species (flax and tomato) on the distribution of nitrogen dissimilative abilities within fluorescent *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol*, 61: 1745-1749.
- Collins, D.P. & Jacobsen B.J. 2003. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. *Biol control*, 26 (2) :153- 161.
- Comby, M., Gacoin, M., Robineau, M., Rabenoelina, F., Ptas, S. & Profizi, C. 2017. Screening of wheat endophytes as biological control agents against *Fusarium* head blight using two different in vitro tests. *Microbiol res*, 202: 11-20.
- Cook, R.J., Brucart, W.L., Coulson, J.R., Goettel, M.S., Humber, R.A., Lumsden, R.D., Maddox, J.V., McManus, M.L., Moore, L., Meyer, S.F., Quimby, P.C., Stack, J.P. & Vaughn, J.L. 1996. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: Framework for scientific evaluation. *Biol. Control*, 7:333-351.
- David, M.P. 2014. <https://fineartamerica.com/featured/2-pseudomonas-aeruginosa-sem-david-m-phillips.html>.
- Davies, G., Greenr, H., Kellyd, R. & Ro-Bertss, M. 1990. Recent advances in the generation of chiral intermediates using enzymes, *Crit. Rev. Biotechnol.* 10,129-152.
- De ley, J. 1992. The Proteobacteria: Ribosomal RNA Cistron Similarities And Bacterial Taxonomy, In: *The Prokaryotes - A Handbook On The Biology Of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* (Balowsa., Truper, H.G., Dworkinm., Harderw., Schleiferk,H., Eds.) 2nd Ed., Pp. 2111-2140, New York: Springe.
- De Wolf, E.D., Madden, L.V. & Lipps, P.E. 2003. Risk assessment models for wheat *Fusarium* head blight epidemics based on within-season weather data. *Phytopathology* 93, 428-435.

- Dehghanpour-Farashah, S., Taheri, P. & Falahati-Rastegar, M. 2019. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp., the causal agent of wheat crown and root rot in Iran. *J Plant Pathol*, 102.
- Demirci, E. & Dane, E. 2003. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. from stem bases of winter wheat in Erzurum, Turkey. *Phytoparasitica*, 31: 170–173.
- Derde, L.J., Gomand, S.V., Courtin, C.M. & Delcour, J.A. 2012. Characterisation of three starch degrading enzymes: Thermostable β -amylase, maltotetraogenic and maltogenic α -amylases. *Food Chem*, 135(2):713-721.
- Deschaght, P., Van Simaey, L., Decat, E., Van Mechelen, E., Brisse, S. & Vanechoutte, M. 2011. Rapid genotyping of *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolates using melting curve analysis of RAPD-generated DNA fragments (McRAPD). *ResMicrobiol*, 162(4), 386–392.
- Desmond, O.J., Manners, J.M., Stephens, A.E., Maclean, D.J., Schenk, P.M., Gardiner, D.M., Munn, A.L. & Kazan, K. 2008. The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defense responses in wheat. *Mol Plant Pathol*, 9: 435-445.
- Desmyttere, H., Deweer, C., Muchembled, J., Sahmer, K., Jacquin, J., Coutte, F. & Jacques, P. 2019. Antifungal Activities of *Bacillus subtilis* Lipopeptides to Two *Venturia inaequalis* Strains Possessing Different Tebuconazole Sensitivity. *Front Microbiol*. 10:2327.
- Dill Macky, R. & Jones R. K. 2000. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Dis*, 84: 71-76.
- Ding, Y., Wang, J., Liu, Y. & Chen. S. 2005. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *J. Appl. Microbiol*, 99:1271–1281.
- Djébali, N. 2012. Seed hydropriming effect on *Triticum durum* and *Hordeum vulgare* germination, seedling growth and resistance to *Fusarium culmorum*. *Plant Pathol J*, 11 : 77–86.
- Djellel, N. & Larous, L. 2018. Biocontrol Activity of *Bacillus megaterium* against the Fungus *Aspergillus flavus* isolated from Poultry Feeds in Algeria. *Annu Res Rev Biol*, 23(3): 1-7.
- Djermoun, A. 2009. Etude sur La production céréalière en Algérie: les principales caractéristiques, Revue Nature et Technologie (Univ. Chlef, Algérie), n. 1, p. 45-53.
- Domingos, D.F., de Faria, A.F., de Souza Galaverna, R. & Oliveira, V. M. 2015. Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99, 3155–3167.
- Doohan FM, Brennan J, Cooke BM, 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109, 755–768.
- Dubuis, C. & Haas, D. 2007. Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in pseudomonads. *Appl Environ Microbiol*, 73: 650-654.
- Duc, P. & Bezet, M. 2003. Blé : comment la fusariose de l'épi joue sur les qualités technologique et sanitaires. *Phytoma*, 566: 19-21.
- Dunlap, C.A., Schisler, D.A., Price, N.P. & Vaughn, S.F. 2011. Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of *Fusarium* head blight. *J. Microbiol*, 49: 603–609.

- Edwards, S., O'Callaghan, J. & Dobson, A.D.W. 2002. PCR based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycol Res*, 106: 1005-1025.
- Edwards, S.G., McKay, T. & Seddon, B. 1994. Interaction of *Bacillus* species with phytopathogenic fungi – Methods of analysis and manipulation for biocontrol purposes. in: Blakeman, J.P. & Williamson, B. [Eds.] *Ecology of Plant Pathogens*. pp. 101-118. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Eljounaidi, K., Lee, S.K. & Bae, H. 2016. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. *Biol Control*, 103, 62–68.
- Essemine, J.E., Ammar, S., Jbir, N. & Bouzid, S. 2007. Sensitivity of two wheat species (*Triticum durum*, variety Karim and *Triticum aestivum* variety (Salambô) to heat constraint during germination. *Pak J of Biol Sci*, 10: 3762–3768.
- Euzeby, J.P. 2008. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. URL <http://www.bacterio.cict.fr>
- Ezzahiri, B. 2001. Les maladies du blé Identification, facteurs de développement et méthodes de lutte. Transfert de technologie en Agriculture. Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA 77, 4p.
- FAO. Food and Agriculture Organisation. 2020. *Crop Prospects and Food Situation - Quarterly Global Report no. 1*, March. Rome. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- FAO. Food and Agriculture Organization. 2018. *Crop Prospects and Food Situation - Quarterly Global Report no. 4*, December 2018. Rome. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- FAO. Food and Agriculture Organization. 2019. *Crop Prospects and Food Situation - Quarterly Global Report no. 4*, December 2019. Rome. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Feiller, P. 2000. Le grain de blé : Composition et utilisation. Edition Quae. INRA. Paris; 308 P.
- Fernandes, P.A.V., de Arruda, I.R., dos Santos, A.F.A.B., de Araújo, A.A., Maior, A.M.S. & doXimenes, E.A. 2007. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. *Braz. J. of Microbiol.*, 38: 704-709.
- Fernando, W.G.D., Paulitz, T.C., Seaman, W.L., Dutilleul, P. & Miller, J.D. 1997. Head blight gradients caused by *Gibberella zeae* from area sources of inoculum in wheat field plots. *Phytopathology*, 87: 414-421.
- Feuilloley, M.G.J., Chapalain, A., Rossignol, G., Lesouhaitier, O., Merieau, A., Geoffroy, V., Guerillon, J., Meyer, J.M. & Orange, N. 2007. Comparative study of seven fluorescent pseudomonad clinical isolates. *Can J Microbiol*, 4: 69-75.
- Fiddaman, P.J. & Rossall, S. 1993. The Production of Antifungal Volatiles by *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol*, 74: 119-126.
- Figueroa-López, A.M., Cordero-Ramírez, J.D., Martínez-Álvarez, J.C. & Maldonado-Mendoza, I.E. 2016. Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *Springer plus*, 5: 330.
- Fravel, D.R. 2005. Commercialization and Implementation of Biocontrol, *Annu Rev Phytopathology*, 43 :337-359.
- Fritze, D. 2004. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. *Phytopathology*, 94(11): 1245-1248.

- Gardes, M., & Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for fungi and Basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol*, 2: 113-118.
- Geiser, D.M., Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kulda, G.A. & O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur J Plant Pathol*, 110: 473–479.
- Gilbert, J. & Tekouz, A. 2000. Effect of *Fusarium* head blight and seed treatment on germination, emergence, and seedling vigor of wheat. *Can J Plant Pathol*, 17: 252-259.
- Gilbert, J., Abramson, D., McCallum, B. & Clear, R. 2001. Comparison of canadian *Fusarium graminearum* isolates for aggressiveness, vegetative compatibility, and production of ergosterol and mycotoxins. *Mycopathologia*, 153: 209-215.
- Ginard, M., Lalucat, J., Tümmler, B. & Römling, Ute. 1997. Genome Organization of *Pseudomonas stutzeri* and Resulting Taxonomic and Evolutionary Considerations. *Int j syst bacteriol*, 47: 132-43.
- Goodwin, D.C. & Lee, S.B. 1993. Microwave mini prep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques*, 15: 438-444.
- Gordon, S.A. & Weber, W.P. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiol*, 26:192–195.
- Gounota, M. 1991. Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological applications, *J. Appl. Bacteriol.* 71:386-397.
- Guenther, J. & Trail, F. 2005. The development and differentiation of *Gibberella zeae* (anamorph: *Fusarium graminearum*) during colonization of wheat. *Mycologia*, 97(1): 229-237.
- Gupta, A. & Gopal, M. 2008. Siderophore production by plant growth promoting rhizobacteria. *Indian J. Agric. Res*, 42 (2): 153 -156.
- Gupta, C.D., Dubey, R.C., Kang, S.C. & Maheshwari, D.K. 2001. Antibiotic Mediated Necrotrophic Effect of *Pseudomonas* GRC2 against Two Fungal Plant Pathogens. *Curr. Sci*, 81: 91-94.
- Gurusiddesh, H. 2012. Isolation and characterization of nitrogen fixing *bacillus subtilis* strain as-4 from agricultural soil. *Int JRec Sci Res*, 3: 762-765.
- Hamadache, A. 2002. Evolution récente des principales ressources fourragères et possibilités d'amélioration en Algérie. *Céréaliculture*, 35: 13-20.
- Hanif, A., Zhang, P., Li, C., Xu, Y., Zubair, M., Zhang, M., Jia, D., Zhao, X., Liang, J., Majid, T., Yan, J., Farzand, A., Wu, H., Gu, Q. & Gao, X. 2019. Fengycin Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 Inhibits *Fusarium graminearum* Growth and Mycotoxins Biosynthesis. *Toxins*, 11(5), 295.
- Hansraj, D., Ratnoo, R.S. & Anita, J. 2018. Isolation of seed borne myco flora of wheat (*Triticum aestivum* L. em. The ll.) Seed samples. *J Pharma Phytochem*, 7(4):162-166.
- Hare, M., Parry, D. & Baker, M. 1999. The Relationship Between Wheat Seed Weight, Infection by *Fusarium culmorum* or *Microdochium nivale*, Germination and Seedling Disease. *Eur J Plant Pathol*, 105, 859–866.
- Hatchett, J.H., Starks, K.J. & Webster, J.A. 2015. Insect and Mite Pests of Wheat. In *Wheat and Wheat Improvement*, E.G. Heyne (Ed.).

- Hiremath, G. 2012. Isolation and characterization of nitrogen fixing *Bacillus subtilis* strain as-4 from agricultural soil. international journal of recent scientific research. 3. 762-765.
- Hollaway, G.J. & Exell, G.K. 2010. Survey of wheat crops for white heads caused by crown rot in Victoria, 1997-2009. Australas. *Plant Pathol*, 39: 363–367.
- Houshaymi, B., Awada, R., Kedees, M. & Soayfane, Z. 2019. Pyocyanin, a Metabolite of *Pseudomonas Aeruginosa*, Exhibits Antifungal Drug Activity Through Inhibition of a Pleiotropic Drug Resistance Subfamily FgABC3. *Drug Res*. 69.
- Hsu, M.C., Chen, K.W., Lo, H.J., Chen, Y.C., Liao, M.H., Lin, Y.H. & Li, S.Y. 2003. Species identification of medically important fungi by use of real-time Light Cycler PCR. *J Med Microbiol*, 52: 1071-1076.
- Hudec, K. 2007. Pathogenicity of fungi associated with wheat and barley seedling emergence and fungicide efficacy of seed treatment. *Biologia, Bratislava*, 62: 287-291.
- Islam, M.A., Nain, Z., Alam, M., & Banu, N.I.R. 2018. *In vitro* study of biocontrol potential of rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Egypt J Biol Pest Control*, 28. 90.
- ITGC (Institut Technique des Grandes Cultures) Algérie. Bulletin des Grandes Cultures N° 8 Juin 2018.
- Jetiyanon, K., Fowler, W.D. & Kloepper, J.W. 2003. Broad-Spectrum Protection Against Several Pathogens by PGPR Mixtures Under Field Conditions in Thailand. *Plant Dis*, 87(11): 1390–1394.
- Jeunot, B. 2005. Les fusariotoxines sur céréales: détection, risque et nouvelle réglementation. Thèse : pour obtenir le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Henri Poincaré-Nancy 1.
- Jiménez-Gasco, M.M., Navas-Cortés, J.A. & Jiménez-Díaz, R.M. 2004. *The Fusarium oxysporum f.sp. ciceris/Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *Int Microbiol*, 7: 95-104.
- Kalpana, H., Gupta, R., & Didwal, G. 2018. Production, optimization of α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *J Adv Res Biol & Pharm Res*, 5 :1-14.
- Kammoun-Gargouri, L., Gargouri, S., Barreau, C., Richard-Forget, F. & Hajlaoui, M. R. 2010. Trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* infecting wheat in Tunisia. *Int J Food Microbiol*, 140: 84–89.
- Kapooria, R.G. & Ndunguru, J. 2004. Occurrence of viruses in irrigated wheat in Zambia. *EPPO Bulletin*, 34: 413-419.
- Karuppiyah, P. & Rajaram, S.K. 2011. Exploring the Potential of Chromium Reducing *Bacillus* sp. and their Plant Growth Promoting Activities. *J Microbiol Res*, 1. 17-23.
- Kellou, R. 2008. Analyse du marché algérien du blé dur et les opportunités d'exportation pour les céréaliers Français.
https://www.iamm.ciheam.org/ress_doc/opac_css/doc_num.php?explnum_id=4390.
- Kezih, R., Bekhouche, F. & Merazka, A. 2014. Some traditional Algerian products from durum wheat. *African Journal of Food Science*, 8: 30–34.
- Khalifah, M. & Matny, O. 2013. Pathogenicity evaluation of *Fusarium spp* isolates, causal agent of crown rot disease in wheat. *Iraqi J Agr Sci*, 44: 480-489.

- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Tyler, I., Maymon, M., Humm, E., Nejat, N., Sanders, E., Kaplan, D. & Hirsch, A. 2018. Antifungal Activity of *Bacillus* Species Against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. *Front Microbiol*, 9: 10.
- Khan, S.A. 2005. Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid*, 53(2): 126–136.
- Kirby, E.J.M. 2002. Botany of the wheat plant. In: BC Curtis, S Rajaram, H Gomez Macpherson, eds. Bread wheat. Improvement and Production. FAO, Rome.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M. & Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94: 1259-1266.
- Köycü, N. 2019. Effect on *Fusarium culmorum* of Fungicides Used in Wheat Seed. *International congress on engineering and life science*, 593-601.
- Kumar, A., Kumar, A., Devi, S., Patil, S., Payal, C. & Negi, S. 2012. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an *in vitro* study. *Recent Res. Sci. Technol*, 4: 01-05.
- Kumar, A., Scher, K., Mukherjee, M., Pardovitz-Kedmi, E., Sible, G.V., Singh, U.S., Kale, S.P., Mukherjee, P.K. & Horwitz, B.A. 2010. Overlapping and distinct functions of two *Trichoderma virens* MAP kinases in cell-wall integrity, antagonistic properties and repression of conidiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 398: 765-770.
- Kumar, S., Tamura, K., Dudley, J. & Nei M. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24: 1596–1599.
- Lamari, L., Strelkov, S.E., Yahyauoi, A., Amedov, M., Saidov, M., Djunusova, M. & Koichibayev, M. 2005. Virulence of *Pyrenophora tritici-repentis* in the countries of the Silk Road. *Can J Plant Pathol*, 27 (3): 383-388.
- Laraba, I., Bouregghda, H., Abdallah, N., Bouaicha, O., Obanor, F., Moretti, A., Geiser, D.M., Kim, H.S., McCormick, S.P., Proctor, R.H., Kelly, A.C., Ward, T.J. & O'Donnell, K. 2017. Fungal population genetic structure and mycotoxin potential of the wheat crown rot and head blight pathogen *Fusarium culmorum* in Algeria. *Fungal Genet Biol*, 103: 34–4.
- Larkin R.P. & Fravel D.R. 2002. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* Wilt of cucumber with Stains of non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 81: 462- 469.
- Latour, X. & Lemanceau, P. 1997. Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie*, 17: 427–443.
- Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F. & Lemanceau, P. 1996. The composition of fluorescent *Pseudomonad* populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ.Microbiol.* 62: 2449-2456.
- Lazreg, F., Belabid, L., Sanchez, J., Gallego, E. & Bayaa, B. 2014. Pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with diseases of Aleppo-pine seedlings in Algerian forest nurseries. *J for sci*, 60: 115–120.
- Lelliott, R.A., Billing, E. & Hayward, A.C. 1996. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J Appl Bacteriol*, 29: 470–489.
- Lemanceau, P., Offre, P., Mougél, C., Gamalero, E., Dessaux, Y., Moenne-Loccoz, Y. & Berta, G. 2009. Microbial ecology of the rhizosphere. In: *Microbiological methods for assessing soil quality*. Bloem, J., Hopkins, D.W. et Benedetti, A. (eds). CABI publishing, Massachusetts, Cambridge, MA, Etats-Unis, pp. 228-230.

- Leonard K.J. & Bushnell W.R. 2003. editors. *Fusarium* Head Blight of Wheat and Barley. APS Press; St. Paul, Minnesota, USA. pp. 44–83.
- Leslie, J. F. & Summerell, A. B. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. Ames, USA.
- Lindberg, G.D. 1981. An antibiotic lethal to fungi. *Pl. Disease*, 65: 680-683.
- Liu, B., Qiao, H., Huang, L., Buchenauer, H., Han, Q., Kang, Z. & Gong, Y. 2009. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* ER-j and potential mode of action. *Biol Control*, 49 : 277–285.
- Liu, R., Liu, H., Feng, H., Wang, X., Zhang, Ch., Zhang, K. & Lai, R. 2008. *Pseudomonas duriflava* sp nov., isolated from a desert soil. *Int J syst evol micr*, 58: 1404-8.
- LNPV : Laboratoire National de la Protection des Végétaux. 2008. Toutes céréales, détection et identification des espèces de *Fusarium spp* et *Microdochium nivale* sur grains de céréales par isolement mycologique semi-sélectif et étude microbiologique. Réf. MH-03.16: version B.
- Lolloo, R., Maharaih, D., Görgens, J. & Gardiner, N. 2010. A downstream process for production of a viable and stable *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *App Microbiol Biotech*, 86: 499-508.
- Loper, J.E. & Henkels, M.D. 1999. Utilization of heterologues siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol*, 65: 5357-5363.
- Lwin, K.M., Myint, M.M., Tar, T. & Aung, W.Z.M. 2012. Isolation of Plant Hormone (Indole-3-Acetic Acid - IAA) Producing Rhizobacteria and Study on Their Effects on Maize Seedling. *Eng. J.*, 16(5): 137-144.
- Mahmoud, D., Mahmoud, A. & Gomaa, A. 2008. Antagonistic activities of Potato Associated Bacteria via their Production of Hydrolytic Enzymes with Special Reference to Pectinases. *Res J Agri Biol Sci*, 4: 575-584.
- Marchadier, E. 2009. Etude fonctionnelle d'un centre d'interactions protéiques chez *Bacillus subtilis* par une approche intégrée. *Thèse de doctorat*, Université de Paris XI, 332p.
- Marín, P., Moretti, A., Ritieni, A., Jurado, M., Vázquez, C. & Teresa G.J. 2012. Phylogenetic analyses and toxigenic profiles of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* isolated from cereals from Southern Europe, *Food Microbiol*, 31(2): 229-237.
- Mastanjević, K., Šarkanj, B., Mastanjević, K., Šantek, B. & Krstanović, V. 2019. *Fusarium culmorum* mycotoxin transfer from wheat to malting and brewing products and by-products. *World Mycotoxin J*, 12: 55-66.
- Matny, O.N. 2015. *Fusarium* head blight and crown rot on wheat & barley: losses and health risks. *Adv Plants Agric Res*, 2(1):38–43.
- Mauler-Machnik, A. & Suty, A. 1997. New finding of the epidemiology, importance and control of *Fusarium* ear blight on wheat. *Cereal Res Commun*, 25: 705-711.
- Mavrodi, O.V., McSpadden Gardener, B.B., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Weller, D.M. & Thomashow, L.S. 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species. *Phytopathol*. 91: 35–43.
- Mesterhazy, A. 1983. Breeding wheat for resistance to *Fusarium graminearum* and *F.culmorum*. *Zeitschrift für Pflanzzüchtung*, 91:295 –311.

- Mesterhazy, A., Bartok, T., Mirocha, C.G. & Komoroczy, R, 1999. Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding*, 118 : 97-110.
- Meyer, J., Stintzi, Alain., Coulanges, V., Sisinthy, S., Voss, JA., Taraz, K. & Budzikiewicz, H. 1998. Siderotyping of fluorescent *pseudomonads*: Characterization of pyoverdines of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* strains from Antarctica. *Microbiology*. 144 (11). 3119-26.
- Mezzalama, M. 2012. Seed Health: Fostering the Safe Distribution of Maize and Wheat Seed: General guidelines. 3rd ed. Mexico, D.F: CIMMYT.
- Michelsen, Ch. & Stougaard, P. 2012. Hydrogen cyanide synthesis and antifungal activity of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* In5 from Greenland is highly dependent on growth medium. *Can J Microbiol*. 58. 381-90.
- Miedaner, T. 1997. Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. *Plant Breeding*, 116 : 201-220.
- Miller, C.S., Handley, K.M., Wrighton, K.C., Frischkorn, K.R., Thomas, B.C. & Banfield, J.F. 2013. Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments. *PloS one*, 8(2):e56018.
- Mishra, A. K., Dutta, S. & Dileep Kumar, B.S. 2005. Effect of fluorescent *Pseudomonas* strains on crop enhancement and suppression of root diseases of tea. Proc. Asian Conf. on Emerging Trends in Pl. Microbe Interactions, Ed. S. S. Gnanamanickam, R. Balasubramanian and N. Anand, Chennai. pp. 26-30.
- Mnasri, N., Chennaoui, C., Gargouri, S., Mhamdi, R., Hessini, K., Elkahoui, S. & Djebali, N. 2016. Efficacy of some rhizospheric and endophytic bacteria *in vitro* and as seed coating for the control of *Fusarium culmorum* infecting durum wheat in Tunisia. *Eur J Plant Pathol*, 147.
- Moule, C. 1971. Phytotechnie spéciale, Tome II Céréales. La maison rustique. Paris, France. 235 p.
- Müller, T., Behrendt, U., Ruppel, S., von der Waydbrink, G. & Müller, M.E.H. 2015. *Fluorescent Pseudomonads* in the Phyllosphere of Wheat: Potential Antagonists Against Fungal Phytopathogens. *Curr Microbiol*, 72(4): 383–389.
- Mulligan, G.A. & Bailey, L. G. 1975. The biology of Canadian weeds. 8. *Sinapis arvensis* L. *Can. J. Plant Sci*. 55: 171-183.
- Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilization microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*, 170: 265- 270.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. The Pennsylvania University Press, London.
- Nganje, W., Johnson, D., Wilson, W., Leistriz, F., Bangsund, D. & Tiapo, N. 2001. Economic Impacts of *Fusarium* Head Blight in Wheat and Barley: 1998-2000. North Dakota State University, Department of Agribusiness and Applied Economics, Agribusiness & Applied Economics Report.
- Nielsen L.K., Jensen, J.D., Rodríguez, A., Jørgensen, L.N. & Justesen, A.F. 2012. TRI12 based quantitative real-time PCR assays reveal the distribution of trichothecene genotypes of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates in Danish small grain cereals. *Int J Food Microbiol*, 157(3): 384-392.

- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E. & Ploetz, R.C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci*, 95:2044–2049.
- Obanor, F. & Chakraborty, S. 2014. Aetiology and toxigenicity of *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* causing crown rot and head blight in Australia under natural and artificial infection. *Plant Pathol*, 63: 1218–1229.
- Okulate, M.A. 2009. Antimicrobial activity of bioactive compound(s) produced by *Bacillus* species, *Final Report for Microbial Diversity Course*, 14p. http://courses.mbl.edu/microbialdiversity/research_projects/research_projects_docs/FinalReports_2009/BolajiOkulate_FinalReport.pdf
- Oliveira, A. N., Oliveira, L.A. & Andrade, J.S. 2010. Partial characterization of amylases of two indigenous Central Amazonian rhizobia strains. *Braz. arch. biol. Technol*, 53(1) : 35-45.
- Olsen, S.R. & Sommers, L.E. 1982. Phosphorus. pp. 403- 430. In: Page, A.L., R.H. Miller et D.R. Weeny (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2*, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- Osborne, L.E. & Stein, J.M. 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *Int J Food Microbiol*, 119, 103– 108.
- Palazzini, J.M., Ramirez M.L., Torres, A.M. & Chulze, S. 2007. Potentiel biocontrol for *Fusarium* head blight and deoxynevalenol production in wheat. *Crop Prot*, 26: 1702-1710.
- Palleroni, N.J. 1984. Genus I. *Pseudomonas* Migula In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.
- Palleroni, N.J. 1992. Present situation of the taxonomy of the aerobic Pseudomonads. In: Galli, E., Silver, S., Wiltholt, B. (Eds.), *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 105–1105.
- Palleroni, N.J. 2009. The genus *Pseudomonas*. pp: 231-242. In: *Practical handbook of microbiology*. Goldman, E. et L. H Green (Eds.). CRC Press, Taylor & Francis Group, USA.
- Palleroni, N.J., Doudoroff, M., Stanier, R.Y., Solanes, R.E. & Mandel, M. 1970. Taxonomy of the aerobic pseudomonads: The properties of the *Pseudomonas stutzeri* group. *J. Gen. Microbiol.* 60:215-231.
- Pandy, A.K., Arora, D.K., Pandey, R.R. & Srivastava, A.K. 1996. Integrated control of *Fusarium* wilt of chickpea by solar heating of soil amended with oilseed meals and fungicides. *Ind Phytopathol*, 49: 247-253.
- Parry, D.W., Jenkinson, P. & McLeod, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals — a review. *Plant Pathol*, 44: 207-238.
- Parvaze, A.W. & Onukwue, I.I. 2014. Screening of Microbes for Their Metal, Antibiotic Resistance and Plant Growth Promoting Activity. *Curr Res Bacteriol*, 7 : 22-31.
- Pathak, N. & Zaidi, R. 2013. Fungi associated with wheat seed discolouration and abnormalities in in-vitro study. *Agric Sci*, 04. 516-520.
- Patten, C.L. & Glick, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Env. Microbiol.*, 68: 3795-3801.

- Peng, D.L., Nicol, J.M., Li, H.M., Hou, S.Y., Li, H.X., Chen, S.L., Ma, P., Li, H.L. & Riley, I.T. 2009. Current knowledge of cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) on wheat in China. In 'Cereal cyst nematodes: status, research and outlook.' (Eds IT Riley, JM Nicol, AA Dababat) pp. 29-34.
- Pereyra, S.A., Dill-Macky, R. & Sims, A.L. 2004. Survival and Inoculum Production of *Gibberella zeae* in Wheat Residue. *Plant Disease*, 88: 724-730.
- Pettit, T., Xu, X., & Parry, D. (2003). Association of *Fusarium* species in the wheat stem rot complex. *Eur J Plant Pathol*, 109, 769–774.
- Poblete-Castro, I., Becker, J., Dohnt, K. Dos Santos, V.M. & Wittmann, C. 2012. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93: 2279–2290.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. 2002. Microbiology, 5th Edition, McGraw-Hill, New York. P :120-150.
- Ramette, A., Frapolli, M., Defago, G. & Moenne-Loccoz, Y. 2003. Phylogeny of HCN synthase encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent *pseudomonads* and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol. Plant Microbe Interact*, 16: 525-535.
- Ramey, B.E., Koutsoudis, M., von Bodman, S.B. & Fuqua, C. 2004. Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr Opin Microbiol*, 7: 602–609.
- Ramos, J.L. 2004. *Pseudomonas*. Kluwer Academic Publisher, New-York. Rebiere-Huet, J., Guerillon, J., Pimenta, A.L., Di Martino, P., Orange, N. & Hulen, C. 2002. Porins of *Pseudomonas fluorescens* MFO as fibronectin binding proteins. *FEMS Microbiol Lett* 215: 121-126.
- Rane, R., Sarode, D., Chaudhari, B. & Chincholkar, B. 2007. Detection, isolation and identification of phenazine-1-carboxylic acid produced by biocontrol strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J sci ind res India*, 66: 627-631.
- Reddy, M.P. & Saritha, K.V. 2016. Effects of the culture media optimization on pectinase production by *Enterobacter sp.* PSTB-1. *3 Biotech*, 6(2): 207.
- Reddy, P.P. 2012. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Rec Adv Crop Prot*, 131–158.
- Rehm-Bernd, H.A. 2008. *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen, Cell Factory. Edited by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. P: 144.
- Renwick, A., Campbell, R. & Coe, S. 1991. Assessment of *in vitro* screening systems of biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathol*, 40: 524-532.
- Richard, E., Heutte, N., Sage, L., Pottier, D., Bouchart, V., Lebailly, P. & Garon, D. 2007. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food Chem Toxicol*, 45(12): 2420–2425.

- Romanenko, L., Uchino, M., Kalinovskaya, N. & Mikhailov, V. 2008. Isolation, phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial, hemolytic and surface activities. *Microbiol res*, 163 : 633-44.
- Rosenberg, A. 1990. The bacterial flora of natural mineral waters and potential problems associated with its digestion, *Riv. Ital. Ig.* 50,303-310.
- Rossignol, G. 2007. Contribution à l'étude de facteurs de virulence d'une souche hospitalière de *Pseudomonas fluorescens* : Activité hémolytique et variation phénotypique. Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Rouen. Discipline : Biologie. Spécialité : Microbiologie, Pp : 2.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Paré, P.W. & Kloepper, J.W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 4927-4932.
- Sadfi, N., Chérif, M., Hajlaoui, M. R., Boudabbous, A. & Bélanger, R. 2002. Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. *Ann. Microbiol*, 52: 323-337.
- Sahu, G.K. & Sindhu, S.S. 2011. Disease control and plant growth promotion of green gram by siderophore producing *Pseudomonas* sp. *Res. J. Microbiol.*, 10: 735- 749.
- Sakr, N. 2017. *In vitro* assessment of *Fusarium* head blight spp. on wheat cultivars. *Arch Phytopathology Plant Protect*, 50(5-6): 254–261.
- Sanguin, H., Sarniguet, A., Gazengel, K., Moëgne-Loccoz, Y. & Grundmann, G.L. 2009. Rhizosphere bacterial communities associated with disease suppressiveness stages of take-all decline in wheat monoculture. *New Phytologist*, 184: 694-707.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. del C. & Govindappa, M. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Sci Techn*, 22(8): 855–872.
- Saremi, H., Ammarellou, A. & Jafary, H. 2007. Incidence of crown rot disease of wheat caused by *Fusarium pseudograminearum* a new soil born fungal species in North West Iran. *Pak J Biol Sci*, 10, 3606 –3612.
- Savard, M.E., Marc, E., Miller, D.J., Salleh, B. & Strange, R. 1990. Chlamydosporol, a new metabolite from *Fusarium chlamydosporum*. *Mycopathologia*, 110: 177-181.
- Sayoud R., Ezzahiri B. & Bouznad Z. 1999. Les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires au Maghreb, Guide Pratique. Projet Maghrébin sur la Surveillance des Maladies et le Développement de Germoplasme Résistant des céréales et des Légumineuses Alimentaires. PNUD RAB/91/007 Maroc-Algérie - Tunisie. Trames Ed, Algérie. 64p.
- Sayed, R., Badgujar, M.D., Sonawane, H.M., Mhaske, M.M. & Chincholkar, S.B. 2005. Production of microbial iron chellators (siderophores) by fluorescent *Pseudomonads*. *Indian J. Biotechnol.*, 4: 484- 490.

- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M. & Migheli, Q. 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Mol Plant Pathol*, 14: 323–341.
- Schisler, D.A., Khan, N.I., Boehm, M.J., Lipps, P.E., Slininger, P.J. & Zhang, S. 2006. Selection and evaluation of the potential of choline-metabolizing microbial strains to reduce *Fusarium* head blight. *Biol Cont*, 39: 497-506.
- Schisler, M. J., Khan, N.I., Boehm, D.A., Lipps, P.E. & Slininger, P. J. 2004. Field testing of antagonists of *Fusarium* head blight incited by *Gibberella zea*. *Biological Control*, 29: 245 – 255.
- Schwyn, B. & Neilands J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Ann Biochem*, 160: 47-56.
- Scott, J., Gordon, T., Shaw, D. & Koike, S. 2010. Effect of Temperature on Severity of *Fusarium* Wilt of Lettuce Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lactucae*. *Plant Dis*, 94(1): 13-17.
- Seddique, S., Yusuf, U. & Zainudi, N. 2010. Morphological and molecular detection of *Fusarium chlamydosporum* from root endophytes of *Dendrobium crumenatum*. *Afr J Biotechnol*, 9: 4081-4090.
- Sempere, F. & Santamarina, S.M. 2014. Efficacy of *Trichoderma harzianum* in suppression of *Fusarium culmorum*. *Ann Microbiol*, 60: 335-340.
- Setter, T.L. & Carlton, G. 2000. The structure and development of the cereal plant. Chapter 2. In: WK Anderson, JR Garlinge, eds. *The Wheat Book, Principles and Practice*. Agriculture Western Australia, pp 23-36.
- Sharma, A. & Johri, B. N. 2003. Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting fluorescent *Pseudomonas* strain GRP3A in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Microbiol Res*, 158: 77-81.
- Sharma, A. & Johri, B.N. 2007. Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting fluorescent *Pseudomonas* strain GRP3A in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Microbiol Res.*, 158: 77-81.
- Shi, C., Yan, P., Li, J., Wu, H., Li, Q. & Guan, S. 2014. Biocontrol of *Fusarium graminearum* growth and deoxynivalenol production in wheat kernels with bacterial antagonists. *Int J Environ Res Public Health*, 11:1094–105.
- Shin, S., Kim, K.H., Kang, C.S., Cho, K.M., Park, C.S., Okagaki, R. & Park, J.C. 2014. A Simple Method for the Assessment of *Fusarium* Head Blight Resistance in Korean Wheat Seedlings Inoculated with *Fusarium graminearum*. *The plant pathology journal*, 30(1) : 25–32.
- Shikur, G.E., Sharma-Poudyal, D., Paulitz, T.C., Erginbas-Orakci, G., Karakaya, A. & Dababat, A.A. 2017. Identity and pathogenicity of *Fusarium* species associated with crown rot on wheat (*Triticum spp.*) in Turkey. *Eur J Plant Pathol*, 150(2), 387–399.
- Shivani, B., Dubey, R.C. & Maheshwari, D.K. 2005. Enhancement of Plant Growth and Suppression of Collar Rot of Sunflower Caused by *Sclerotium Rolfsii* Through Fluorescent *Pseudomonas*. *Indian Phytopathol.*, 58(1): 17-24.

- Shoresh, M. & Harman, G. & Mastouri, F. 2010. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annu rev phytopathol*, 48: 21-43.
- Siddiqui, Z. 2006. PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. PGPR: Biocontrol and Biofertilization, 111-142.
- Sindhu, S. S., Rakshiya, Y.S. & Sahu, G. 2009. Biological control of soilborne pathogens with rhizosphere bacteria. *Pest Technol*, 3 : 10-21.
- Singh, R., Parameswaran, T.N., Prakasa Rao, E.V.S., Puttanna, K., Kalra, A., Srinivas, K.V.N.S., Bagyaraj D.J. & Divya, S. 2009. Effect of *arbuscular mycorrhizal* fungi and *Pseudomonas fluorescens* on root-rot and wilt, growth and yield of *Coleus forskohlii*, *Biocontrol Sci Techn*, 19: 835-841.
- Siou, D. 2013. Développement épidémique de la fusariose des épis de blé et conséquences des interactions entre espèces du complexe fusarien. *Thèse de doctorat*, Université de Paris-SUD 11, 197.
- Sivan, A., Ucko, O. & Chet, I. 1987. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field condition. *Plant Disease*, 71: 587–595.
- Smiley, R.W. & Patterson, L.M. 1996. Pathogenic fungi associated with *Fusarium* foot rot of winter wheat in the semiarid pacific northwest. *Plant Dis*, 80(8).944-949.
- Snijders, C.H.A. 1994. Breeding for resistance to *Fusarium* in wheat and maize. In: Miller JD, et al. editors. *Mycotoxins in Grain – Compounds other than Aflatoxin*. USA: Eagan Press. p. 37–58.
- Soltner, D. 2016. Les grandes productions végétales : céréales, plantes sarclées, prairies. Sainte-Gemme-sur-Loire, Sciences et Techniques Agricoles. 22ed, pp : 13-22.
- Song, W., Zhou, L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L. & Liu, X. 2004. Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. *Crop Protection*, 23: 243-247
- Spiers, A., Buckling, A. & Rainey, P. 2000. The cause of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*. 146 (10). 2345-50.
- Sreedevi, B., Preethi, S. & Pramoda, K.J. 2014. Isolation, production and optimization of siderophore producing *Pseudomonas* from paddy soil. *Int J Pharm Res Sci*, 02: 71-88.
- Stallwood, B., Shears, J., Williams, P. & Hughes, K. 2005. Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica. *J App Microbiol*, 99: 794-802.
- Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. & Doudoroff, M. 1996. The aerobic *pseudomonads*, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159-271.
- Stenseth, N.C., Leirs, H., Skonhofs, A., Davis, S.A., Pech, R.P., Andreassen, H.P., Singleton, G.R., Lima, M., Machang'u, R.S., Makundi, R.H., Zhang, Z., Brown, P.R., Shi, D. & Wan, X. 2003. Mice, rats, and people: the bio-economics of agricultural rodent pests. *Front Ecol Environ*, 1: 367-375.
- Strausbaugh, C.A., Overturf, K. & Koehn, A.C. 2005. Pathogenicity and real-time PCR detection of *Fusarium* spp. in wheat and barley roots. *Can J Plant Pathol*, 27(3), 430–438.
- Suryakala, D., Umamaheshwari, D.P. & Vijaya L.K. 2004. Chemical characterization and *in vitro* antibiosis of siderophores of rhizosphere florescent pseudomonads. *Indian J. Microbiol.*, 44: 105-107.

- Talaro K.P & Talaro, A. 2002. The Gram positive Bacilli of medical importance In : Foundation in microbiology, 4th Edition.
- Tan, D.C., Flematti, G.R., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K., Chakraborty, S., Obonor, F., Barbetti, M.J. 2012. Mycotoxins produced by *Fusarium* spp. associated with *Fusarium* head blight of wheat in Western Australia. *Mycotoxin Res*, 28(2): 89–96.
- Teather, R.M. & Wood P.J. 1982. “Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *App Env Microbiol*, 43(4): 777–780.
- Thakore, Y. 2006. The biopesticide market for global agricultural use, *industrial biotechnology*, 2(3) : 294-208.
- Todar, K. 2008. Online Textbook for Bacteriology: The Genus *Bacillus*. <http://www.textbookofbacteriology.net>.
- Touati-Hattab, S., Barreau, C., Verdal-Bonnin, M.N., Chereau, S., Richard-Forget, F., Hadjout, S. & Bouznad, Z. 2016. Pathogenicity and trichothecenes production of *Fusarium culmorum* strains causing head blight on wheat and evaluation of resistance of the varieties cultivated in Algeria. *Eur J Plant Pathol*, 145(4) : 797–814.
- Tousson, T.A. & Nelson, P.E. 1976. *Fusarium* a pictorial guide to the identification of *Fusarium* species according to the taxonomic system of synder and Hansen. Second edition the persel Perselvania University Press. University Park and London. 43 p.
- Trail, F. 2009. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiol*, 149(1): 103-110.
- Vincent, J.M. 1947. Distortion of Fungal Hyphae in the Presence of Certain Inhibitors. *Nature*, 150: 850.
- Visca, P., Imperi, F. & Lamont, I.L. 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol*. 15: 22–30.
- Vogelgsang, S., Sulyok, M., Hecker, A., Jenny, E., Krska, R., Schuhmacher, R. & Forrer, H.R. 2008. Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *Eur J Plant Pathol*, 122, 265–276.
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D. & Défago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *Eur Mol Biol Organ J*, 8: 351- 358.
- Wachowska, U., Packa, D. & Wiwart, M. 2017. Microbial Inhibition of *Fusarium* Pathogens and Biological Modification of Trichothecenes in Cereal Grains. *Toxins*, 9(12) : 408.
- Wagacha, J.M. & Muthomi, J.W. 2007. *Fusarium culmorum*: infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Prot*, 26: 877-885.
- Walsh, U.F., Morrissey, J.P. & O’Gara, F. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr Opin Biotechnol*, 12: 289-295.
- Walter, S., Nicholson, P. & Doohan, F.M. 2009. Research review: Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytol*, 185, 54–66.
- Wendy, A.J., Robert H.J., Jeffrey, A.J., Gregory, D.K., William, G., Mary, E.B. & Alan, T. D. 2008. Root Lesion Nematodes in Wheat. *Plant Dis B-10*, 2/08.

- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot*, 52:487–511.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J., (Eds). PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego. pp. 315-322.
- Winter, M., Samuels, P.L., Dong, Y. & Dill-Macky, R. 2019. Trichothecene production is detrimental to early root colonization by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in fusarium crown and root rot of wheat. *Plant Pathol*, 68: 185-195.
- Wu, A.B., Li, H.P., Zhao, C.S. & Liao, Y.C. 2005. Comparative pathogenicity of *Fusarium graminearum* isolates from China revealed by wheat coleoptile and floret inoculations. *Mycopathologia*, 160: 75-83.
- Xu, X.M. & Nicholson, P. 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annu Rev Phytopathol*, 47, 83–103.
- Xu, X.M., Parry, D.W., Nicholson, P., Thomsett, M.A., Simpson, D., Edwards, S.G. & Tatnell, J. 2005. Predominance and association of pathogenic species causing *Fusarium* ear blight in wheat. *Eur J Plant Pathol*, 112(2):143–154.
- Yang, J., Kloepper, J.W. & Choong-Min, R. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci*, 14: 1–4.
- Yu, J.B., Bai, G.H., Zhou, W.C., Dong, Y.H. & Kolb, F.L. 2008. Quantitative trait loci for *Fusarium* head blight resistance in recombinant inbred population of Wangshuibai/Wheaton. *Phytopathology*, 98: 87-94.
- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q. & Huang, Q. 2012. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Appl Environ Microbiol*, 78(16): 5942–5944.
- Yuen, G.Y. & Schoneweis, S.D. 2007. Strategies for managing *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Int J Food Microbiol*, 119 : 126-130.
- Zahri, S., Farih, A., Badoc, A. & Douira A. 2013. Statut des principales maladies, cryptogamiques foliaires du blé au Maroc en 2013. *J App Biosci*, 77, 6543–6549.
- Zhao, Y., Selvaraj, J.N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y.M. & Liu, Y. 2014. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PloS one*, 9(3) : e92486.
- Zillinsky, F.J. 1983. Maladies communes des céréales à paille. Guide d'identification CIMMYT. 141 p.
- Zou, C., Ming-He, M., Ying-Qi, G., Jun-Pei, Z. & Ke-Qin, Z. 2007. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 2371-2379.

ملحق 1

أوساط الزرع

* الوسيط PSA (Potato Sucrose Agar)

- من أجل تحضير 1ل من الوسيط يتم:
- غسل ثم تقطيع 200غ من البطاطا (دون تقشير)
- غلي قطع البطاطا لمدة 15-20د.
- إضافة 15غ من الأغار و15غ من السكروز، ثم يتم تعديل الحجم الى 1000مل.
- يسخن المجموع حتى ذوبان الأغار (الغليان)، ثم تعديل الأس الهيدروجيني.

* الوسيط SNA (Spezieller Nährstoffärmer Agar)

- K_2HPO_4 : 1.0 ± 0.1 g
- KNO_3 : 1.0 ± 0.1 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.5 ± 0.1 g
- KCl : 0.5 ± 0.1 g
- Glucose : $0,20 \pm 0.05$ g
- Saccharose : $0,20 \pm 0.05$ g
- Agar : 20 ± 1 g
- H_2O distillée ou osmosée : 1000 ± 10 ml

* الوسيط CLA (Carnation Leaf Agar)

- تقطيع أوراق القرنفل الطازجة الخالية من الأمراض إلى قطع بحجم 1 سم².
- تجفيفها بالفرن لمدة 3 إلى 4 ساعات عند 110 درجة مئوية.
- تحضير وتعقيم أجار الماء (WA) بمعدل 15 غ/ل.
- عند صب الوسيط في الأطباق، يتم وضع 4 أو 5 قطع من أوراق القرنفل، متباعدة قليلاً مع بعضها البعض، في الوسيط الذائب (قبل أن يتصلب).
- تترك العلب على الأقل 3 أيام من أجل الكشف عن أي تلوثات محتملة.

(King B) KB الوسط

- Peptone Bactériologique 20,0 g
- Glycérol 10,0 g
- Hydrogénophosphate de potassium 1,5 g
- Sulfate de magnésium heptahydraté 1,5 g
- Agar 12,0 g
- pH = 7,2

YMA وسط *

Yeast Extract	1g
Amidon	10g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄	0,2g
NaCl	0,1g
CaCO ₃	1g
Agar	15
WATER	1000ml

CMC agar وسط *

KH ₂ PO ₄	2g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3g
CaCl ₂	0.3g
yeast extract	0.4g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.005g
MnSO ₄	0.0016g
ZnCl ₂	0.0017g
CoCl ₂	0.002g
CMC	5g
Agar	15g

NBRIP وسط *

GLUCOSE	10g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5g
MgCl ₂ 6H ₂ O	5g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,25g
KCl	0,2g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1g
AGAR	15g
WATER	1000ml

* وسط الكيتين (غ/ل)

KHPO ₄	0.7	Chitine	4
KH ₂ PO ₄	0.3	MnCl ₂	0.001
MgSO ₄ .H ₂ O	0.5	NaCl	0.3
FeSO ₄	0.01	Yeast extract	0.2
ZnSo ₄ .7H ₂ O	0.07	Agar	15

* وسط البكتين (غ/ل)

Pectine	4
Peptone	0.5
Beef extract	0.3
NaCl	0.5
Agar	15

* وسط CAS

:HDTMA -1

- يذاب ما مقداره 1.821 غ من HDTMA (Hexamethylammoniumbromure) في 40 مل من الماء المقطر.

- توضع 10 مل من HDTMA (10 mM) في أنبوب مدرج ثم يكمل الحجم الى 50 مل (محلول 1).

:CAS -2

- يذاب ما مقداره 2.7 مغ من FeCl₃, 6 H₂O في 10 مل من HCl (10 mM).

- يذاب 1.2 غ Chrome azuro1 (CAS) في 50 مل من الماء المقطر.

- يمزج المحلولان جيدا من أجل الحصول على محلول جديد ذو لون بنفسجي غامق (محلول 2).

3- يضاف المحلول 2 الى المحلول 1 ببطء مع التحريك (نتحصل على محلول أزرق غامق).

4- محلول Pipes (منظم pH)

- يذاب ما مقداره 4.307 غ من piperazine anhydre في الماء ثم يضاف اليه 6.25 مل من HCl (1,2 M).

- يضاف المحلول المنظم ثم يكمل الحجم الى 100 مل باستعمال الماء المقطر.

* وسط Winogradsky

1- محلول التخزين (غ/ل)

KH ₂ PO ₄	50
MgSO ₄ .7H ₂ O	25
NaCl	25
FeSO ₄ .7H ₂ O	1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1
MnSO ₄ .4H ₂ O	1
Distilled Water	1000ml

- أخيراً، يعدل الـ pH الى 6.2 باستعمال H₂SO₄

2- تحضير وسط الزرع Winogradsky الخالي من الأزوت

- محلول التخزين 5مل

- D Glucose 0.5 غ

- CaCO₃ 0.1 غ

- الماء المقطر 1000 مل. ثم يعدل الـ pH الى 6.2 باستعمال H₂SO₄.

ملحق 2

1- التسلسلات النيكلوتيدية المستعملة في التعريف الجزيئي للعزلات الفيوزاريوم.

العزلة FC1:

F. culmorum FC1 EF-1 (445 bp)

```
CGTCTGATAGTCGTGTTAGTATGAGAATGTGATGACAGCAGTAGTGACAACATACCAATGAC
GGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCGATATCAATGGTGATACCACGCT
CACGCTCGGCTTTGAGCTTGTC AAGAACCCAGGCGTACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCG
GCGGCTTCCTATTGACAGGTGGTTAGTAACTGATTGACACGTGATGGTGCGCGCCTAGGGAA
TGGTTTGTGGGAAGAGGGCAAGCGCCTGTCGCTCGAGTGGCGGGGTATGAGCCCCACCAGA
AAAATTACGACAAAGCCGCAAAAATTTTTGACCTCGAGCGGGGTAACAGGCGCGTATCGAGTC
GTCGTGTGAGGGCGATTTCGAATGATGTTTCGAAAGGGAAAAGGGCGCGCGATCGAGGAAAA
TGAGACCAACCTT
```

F. culmorum FC1 ITS (481 bp)

```
ACATTCAGAAGTTGGGGTTTAAACGGCGTGGCCGCGACGATTACCAGTAACGATATGTAAATT
ACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATGTATTTGGGGAGTGCAGCAGGACTGCAGC
TCCCAACACCAAGCTGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAAT
ACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAC
TTATCGCATTTTGTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTT
GATTTATTTGTTTTTATACTCAGAAGTCCACTAAAAACAGAGTTTAGGGTTCCTGCGGCGG
```

GCCGTCCCTTTTTACGGGGCGCGGGCTGATCCGCCGGGCAACATAAGGTATGTTACAGGGG
TTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGGTTCC

:العزلة FC2

F.culmorum FC2 EF-1 (446 bp)

CGTCTGATAGTCGTGTTAGTATGAGAATGTGATGACAGCAGTAGTGACAACATACCAATGAC
GGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCGATATCAATGGTGATAACCACGCT
CACGCTCGGCTTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGCGTACTTGAAGGAACCCTTACCGAGCTCG
GCGGCTTCCTATTGACAGGTGGTTAGTAACTGATTGACACGTGATGGTGCGCGCCTAGGGAA
TGGTTTGTGGGAAGAGGGCAAGCGCCTGTCGCTCGAGTGGCGGGGTATGAGCCCCACCAGA
AAAATTACGACAAAGCCGCAAATTTTTGACCTCGAGCGGGGTAAACAGGCGCGTATCGAGTC
GTCGTGTGAGGGCGATTTCGAATGATGTTTCGAAAGGGAAAAGGGCGCGCGATCGAGGAAAA
TGAGACCAACCTTC

:العزلة FCh

F.chlamydosporum EF (453 bp)

CGTCTGGAAGGCATGTTAGTATGAGCATAACAATGACAGTAACAGTGACAACATACCAATGAC
GGTGACATAGTAGCGGGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCGATATCGATGGTGATAACCACGCT
CACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGCGTACTTGAAGGAACCCTTACCGAGCTCG
GCGGCTTCCTATTGTCAGATTGTTAGTGACTGACACACACGTGATGATGCGCGCCCAGATGA
ATAATGGCTTTTGTGGGAAGAGGGTAAGCGCCCGTCACTCGAGTGGCGGGGTAGAGGCCCA
CCAAAAAATTACGACAGAACCGCAAATTTTTGAGCTCGAGCGGGGTAAACGGACGCTTGT
CAAGTCGTCGTGAAAGAGCGATTTCGAATGATATATCGATGGGTATGAGGGCGCGCGATCGA
GGAAAATGAGACCAACCTTC

F.chlamydosporum ITS (509 bp)

AGGTCAACATTCAGAAGTTGGGGGTTTAAACGGCTTGGCCGCGCCGCGTTCCAGTTGCGAGGT
GTTAGCTACTACGCAATGGAGGCTGCAGCGAGACCGCCACTAGATTTCCGGGGCCGGGCCGCG
GAGAACCGCAGGCCCGATCCCCAACACCAACCCGGGGGTTTGAAGGTTGAAATGACGCTC
GAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCA
CTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTTGCTGCGTTCCTCATCGATGCCAGAACCA
AGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTGTTTTTAAACTCAGAAGTTACAATAAAAATT
CAGGGTTTGTGGGTCCTGCGGCGGGCCGTCCCGTTTTACGGGGCGCGGGCTGATCCGCCGAG
GCAACGTATAGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCA
GGTTCACCTACG

:العزلة Feq25

F.equiseti EF (422 bp)

ATGTTAGCATGAGAAGGTAATGAGTGTGAGTGATGACAACATACCAATGACGGTGACATAGT
AGCGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCGATATCAATGGTGATAACCACGCTCACGCTCGGCC
TTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGCGTACTTGAAGGAACCCTTACCGAGCTCGGCGGCTTCCTA
TTGTCGGGTGGTTAGTGACTGATTGACACGTGATGCGCAAGAAGTGATTTTGTGGGAAGAGG
GCAAGCGCGTGTCACTCGAGTAGCGGGGTATAAGCCCCACCAAATATTGCGGTTGAACCGC

AAAATTTTGTACTCGAGCGGGGTAACAGGCGCATATTCAGTCGAGACTGATTCTGAATGATGG
ATCGGTGGGCAGAGGGCGTGCGATCGAGGAAAATGGAAACCAACCTTCTC

F. equiseti ITS (493 bp)

AGGTCAACATTCAGAAGTTGGGGTTTTACGGCGTGGCCGCGACGATTACCAGTAACGAGGTG
TATGATTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATCGATTTGGGGAACGCGGGTTAC
CGCGAGTCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGC
CAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTC
ACATTACTTATCGCATTTTGTCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGA
AAGTTTTGATTTATTTGTTTGTTTACTCAGAAGTTCCACTAAAACAGAGTTTAGGGGTCCT
CGGGCGGGCCGTCCCTTTTTACGGGGCGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACGTATAGGTATGT
TCACAGGGGTTTGGGAGTTGTAACACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCTACG

العزلة Feq28:

F. equiseti EF (423 bp)

GCATGTTAGCATGAGAAGGTAATGAGTGTAAGTGATGACAACATACCAATGACGGTGACAT
AGTAGCGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCGATATCAATGGTGATACCACGCTCACGCTCG
GCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGCGTACTTGAAGGAACCTTACCGAGCTCGGCGGCTTC
CTATTGTCGGGTGGTTAGTGACTGATTGACACGTGATGCGCAAGAACTGATTTTGTGGGAAG
AGGGCAAGCGCGTGTCACTCGAGTAGCGGGGTATAAGCCCCACCAAAATATTGCGGTTGAAC
CGCAAAATTTTGTACTCGAGCGGGGTAACAGGCGCATATTCAGTCGAGACTGATTCTGAATGA
TGGATCGGTGGGCAGAGGGCGTGCGATCGAGGAAAATGGAAACCAACCTTCT

2- التسلسلات النيكلوتيدية المستعملة في التعريف الجزيئي لعزلات الـ *Fusarium* والعزلات البكتيرية.

Bacillus subtilis B14 MT072216 (948 bp)

GGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGG
AACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGA
CTGCGATCCGAACAGAAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTG
TCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTC
CGGTTTGTACCCGGCAGTCACTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGC
TCGTTGCGGGACTTAAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTG
CCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAGTCTTGC
GACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACA
CTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTC
CTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCA
CCGCTACACGTGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGT
TGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGA
CAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTG

Bacillus atrophaeus B16 MT072217 (1048 bp)

CTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGG
GCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAG
CTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACAGAAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACTCGC
GGTCTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATT
TGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTGACCCGGCAGTCACTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGC
AACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAA

CCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGAAGCCCTATCTCTAGGGGTGTCAGAGGATGTCAA
GACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTC
AATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTAACCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCAC
TAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATC
CTGTTTCGCTCCCCACGTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTG
TTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCC
CCAGTTTCCAATGACCCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAG
CCCTTTACGCCAATAATTCCGGACACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTA
GCCGTGGCTTTCTGGTAGGTACCGTCAGGTGCCGCTATTGAACGGACTTGTCTTCCTAACACAGAGC
TTACGATCGAACTTC

Bacillus amyloliquefaciens BB18 MT072218 (1120 bp)

ACGAGAGGCTGGATCCTAATAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGG
GCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAG
CTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAACCTCGC
GGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATT
TGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGC
AACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAA
CCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAG
ACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCA
ATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTAACCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACT
AAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC
TGTTTCGCTCGCCACGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGT
TCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCC
CAGTTTCCAATGACCCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGC
CCTTTACGCCAATAATTTCCGGACGACGCTTGCCACCTACGTATTAACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTA
GTCGTGGCTTTCTGGTTAGTACGTCAAGGGCCGCTATTTGAACGGACTTGTCTTCCTAACACAGAGC
TTACGATCGAAACTTCATCCTCAGCGGGGTGCTCGTCGACTTTCGTCATGGGAAGATCCTATGCTGCT
CCGAAGAGTGGGCGGTTCA

Bacillus subtilis S8 MT077868 (955 bp)

GGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGT
CGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAACCTCGCGGTTTCGCTGC
CCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCC
CCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCA
AGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
CTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAG
GTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAG
TTTCAGTCTTGCAGCCGTAACCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGACTAAGGGGCGGA
AACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCC
CACGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATC
TCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAAT
GACCCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCTTTACGCCA
ATAATTCGGACACGCTTGCCACTACGTATTACCGCGCTGCTGGACGTATTTAGCCGGGCTT

Bacillus amyloliquefaciens BB19 MT072219 (955 bp)

AAGCCCGGCTAAATACGTCCAGCAGCGCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGTGTCCGAATTATTGGCGTA
AAGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG
TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG

GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTT
 CCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA
 ACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGAC
 AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACC
 CTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
 TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACA
 AAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCA
 ACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGG
 GCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAG
 GAGCC

ملحق 3

عدوانية البكتيريا الجذرية على عزلات الـ *Fusarium* الثلاث.

FC1 Bacillus		FC2 Bacillus		FCh Bacillus		FC1 Pseudomonas		FC2 Pseudomonas		FCh Pseudomonas	
Bacteria	Mean	Bacteria	Mean	Bacteria	Mean	Bacteria	Mean	Bacteria	Mean	Bacteria	Mean
B16	71,05	B16	75,68	B14X	79,41	M17-3	57,02	M2-2	50,00	S14-2	47,06
BB19	67,54	S37	72,97	M17-1	68,63	BB15-5	48,25	S5	49,12	BB4-1	46,08
BB18	67,54	B14	72,07	BB19	67,65	BB4	48,25	S14-2	48,25	BB4	46,08
B9-1	67,54	BB19	70,27	B18-1	67,65	S7-1	45,61	M17-2	47,37	S18	45,10
B18-2	66,67	S29	69,37	B18-2	64,71	BB4-1	44,74	B18-3	43,86	S9-2	43,14
B1-2	66,67	S21	69,37	B16	62,75	B18-3	42,98	S18	42,98	S20-3	42,16
BB18-3	65,79	BB9-1	68,92	S29	61,76	S26	42,98	BB4	42,98	BB4-2	42,16
BB18-4	65,79	M8	68,47	BB18-3	61,76	M2-3	42,11	S17-1	42,11	B18-3	41,18
BB12-1	65,79	M11-1	68,47	B20	61,76	S7-3	40,79	B18-2	41,23	M2-2	41,18
M4	65,79	M4-1	68,47	BB12-1	61,76	S9-5	40,79	S18-2	41,23	BB4-4	41,18
S8	65,34	BB2-1	68,47	B9-1	61,76	M2-2	40,35	BB15-5	40,35	M17-3	40,20
B3-2	64,91	BB18	68,47	S33	60,78	S5	40,35	S1	40,35	S12-3	39,22
M8	63,16	B20	68,47	B14-2	60,78	S18	40,35	S7-3	39,47	S26	38,24
M11-1	63,16	B1-3	67,57	S12P	60,29	S12-3	40,35	S26	39,47	S14-3	37,25
B20	63,16	S8	67,57	BB18-P	60,29	S14-3	40,35	S37-1	39,47	B3-4	36,27
M2P	63,16	BB18-4	66,67	M2-P	59,80	S26	40,35	BB4-1	39,47	B18-2	36,27
S12-1	63,16	M17-1	66,67	M4	59,80	S9-4	40,35	S7-1	38,60	S9-3	36,27
S21	60,95	B18-1	66,67	S21	58,82	S20-3	40,35	S9-1	38,60	B14-4	35,29
B18-1	59,65	B7	65,77	BB18	57,84	M17-2	39,47	S14-3	37,72	BB15	32,35
S12-3	59,21	BB18-3	65,77	S29-3	56,86	S29-2	39,47	BB4-4	37,72	BB15-6	35,29
S29	57,89	B3-2	65,76	B1-2	56,86	S1	39,47	BB18-1	37,72	S26-3	35,29
S29-3	56,14	B1-2	65,76	B3-2	56,86	BB4-2	39,47	B12	37,72	S7-1	35,29
S26-1	55,26	S33	65,46	M4-2	52,94	M4-2	38,60	S18-1	37,72	S17-1	35,29
S18-1	53,51	BB15-4	64,86	BB18-4	52,94	M4-2	37,72	M11-1	36,84	S7-3	35,29
S17-1	51,75	M2-P	64,86	BB15-4	51,96	BB4-4	31,14	S20-3	36,84	M8-1	34,31
S14-3	50,88	B14-2	63,96	S8	51,96	S17-2	28,07	S9-2	36,84	B3-3	33,33
S18	50,88	B9-1	63,96	S29-1	51,96	S9-3	27,63	BB4-2	36,84	BB9-3	33,33
S29-1	49,12	B5-2	63,96	S18	50,98	S12-1	26,32	B14-5	36,84	M6-3	33,33
B1-1	49,12	S26P	62,16	S26P	50,00	M20-4	25,44	S12-3	35,96	S5	33,33
B14-1	49,12	S33-1	59,46	M11-1	48,04	M11-1	25,44	B16-3	34,21	BB18-1	33,33
S38	49,12	S12P	58,56	BB12-3	47,06	M2-1	24,56	B16-1	33,33	S26-2	32,35
S14-2	48,25	BB18P	56,75	B3-1	46,08	B16-1	24,56	B3-2	32,46	S29-2	32,35
M14-3	47,37	M17-2	54,06	M8	46,08	S12-2	24,56	S38-2	28,95	BB15-1	32,35
S37	47,37	S21-1	54,06	S12-1	45,59	M8-4	23,68	M8-4	28,07	B14-5	31,37
B5-3	46,49	S14-3	50,79	M2-1	44,12	B14-2	23,68	S5-2	26,32	B18-1	31,37
S29-4	46,49	B3-1	50,58	B9-2	44,12	S18-2	23,68	S9-3	25,00	B16-3	31,37

BB1-3	46,49	M2-1	50,58	S14-2	42,16	S38-2	22,81	M8-5	22,81	S5-2	31,37
S18-2	46,05	BB12-3	50,45	S7-1	42,16	B15-3	22,81	S12-1	21,05	B14-2	31,37
B1-3	45,62	S26-2	50,00	M20-3	42,16	B14-5	22,81	S5-1	20,61	M17-1	31,37
S7-1	45,62	BB4-3	48,09	S26-1	41,18	S5-1	22,81	S26-3	20,18	S38-2	31,37
B20-1	45,62	S29-1	46,51	BB19-3	41,18	M8-5	21,93	M4-2	20,18	B16-1	30,39
BB12-3	44,74	M20-3	46,40	BB4-2	41,18	B18-1	21,93	S9-4	19,30	M2-1	30,39
BB4-2	44,74	BB4-1	46,40	M6-2	40,20	B3-4	21,93	S29-2	18,42	M8-3	30,39
S12-1	44,74	M20-3	45,95	BB1-3	40,20	B3-5	21,93	M17-1	17,54	S17-2	30,39
M2-2	44,74	B14-1	45,50	M20-2	39,71	B16-2	21,93	BB15	17,54	S29-1	30,39
BB4-3	44,74	M8-2	45,17	S1-1	39,22	M17-1	21,05	M17-3	17,54	B3-1	30,39
M20-2	44,74	S12	44,15	B14-1	39,22	B16	21,05	M2-1	16,67	M11-1	29,41
M6-1	44,74	S38	44,15	S26-2	38,24	B3-1	21,05	B7-3	15,79	S12-2	29,41
M6-2	44,74	M6-2	43,80	S7-2	38,24	M8-1	20,18	S9-5	15,79	S9-1	29,41
S17-3	44,74	BB4-3	43,80	M2-2	38,24	B18-2	20,18	B18-1	15,79	M17-3	29,41
S5-2	44,74	BB1-1	43,25	S1-2	37,25	S7-4	20,18	B16-2	15,79	B15-3	28,43
S29	44,74	BB15-3	42,90	S17-1	37,25	M6-1	19,30	BB1-1	15,79	M20-4	28,43
S21-1	44,74	S18-2	42,32	S14-3	37,25	B7-3	19,30	B14-2	15,79	S37-1	28,43
S17-2	44,74	B5-1	42,21	M6-1	37,25	BB12-1	19,30	BB18-3	14,91	B7-3	28,43
S23-1	43,86	S7-1	42,11	BB9-1	37,25	B3-3	18,42	S17-2	14,91	B16-2	28,43
S33	43,86	S38	42,11	B1-1	37,25	B14-4	18,42	S12-2	14,47	B7-4	27,45
S9-1	43,86	B5-3	41,60	S14-3	37,25	B12-2	18,42	S7-4	14,04	M2-4	27,45
BB9-1	43,42	BB15-1	41,10	BB4-3	37,25	B7-4	18,42	M20-3	14,04	M8-4	27,45
M20-3	43,42	BB4-1	40,31	B7	37,25	S38-1	18,42	B3-4	14,04	M20-3	27,45
B14X	42,99	BB12-2	40,31	S23-1	36,76	BB18-3	18,42	B14-4	14,04	S38-1	27,45
M17-2	42,98	B1-1	39,01	S33	36,27	BB15	18,42	M8-1	13,16	BB1-1	27,45
B9-3	42,98	M11-3	38,59	M20	35,29	BB15-1	18,42	BB15-6	12,28	BB9-2	27,45
B7	42,98	M17-3	38,51	S17-3	35,29	M20-3	17,54	M20-4	12,28	S18-2	27,45
B3-3	42,11	M2-2	37,45	BB15-1	35,29	S29-1	16,67	B3-3	12,28	M2-3	26,47
S1-2	42,11	S12-1	36,96	S12-3	34,31	BB9-2	16,67	B3-1	12,28	BB12-1	25,49
S9	42,11	B20-1	36,70	S21-1	34,31	B3-2	16,67	BB9-3	11,84	B3-2	25,49
M17-1	41,23	BB19-2	34,94	S17-2	34,31	S26-2	16,67	BB12	11,40	M17-2	24,51
BB15-1	41,23	S9-1	33,38	S7-3	34,31	BB1-2	16,67	BB15-1	11,40	M6-2	24,51
B5-2	41,23	B9-3	32,41	S38	34,31	BB9-3	16,67	M6-1	11,40	S9-5	24,51
S7-2	40,79	S26-1	32,35	S29-4	34,31	BB12-2	15,79	M2-4	10,53	B18-1	24,51
S1-1	40,35	S7-2	31,75	S12	33,82	S9-1	15,79	S26-2	9,65	M6-1	23,53
M17-3	40,35	S7-3	25,40	S29	33,33	S37-1	15,35	S38-1	9,65	B12	22,55
BB19-3	39,47	B9-2	21,43	S18-1	33,33	BB9-1	14,91	M6-3	9,65	M4-2	22,55
BB4-1	39,47	M4-2	20,63	BB15-3	33,33	M6-2	14,91	B7-1	9,65	S12-1	22,55
BB9-1	38,60	S5-2	16,67	B5-2	33,33	S9-2	14,47	B14-1	9,65	B3-5	21,57
M20	36,84	M6-1	16,67	B1-3	32,35	M6-3	14,04	BB9-2	8,77	B12-2	21,57
BB1-1	36,84	M20-2	14,29	B3-3	32,35	B16-3	14,04	BB18-2	8,77	S7-4	20,59
BB19-2	26,32	BB9-2	13,49	S18-2	32,35	S14-2	14,04	B3-5	8,77	B15-4	20,59
BB9-2	23,68	S17-2	11,91	B9-3	32,35	S5-2	14,04	S29-1	7,89	M8-5	17,65
M8-2	21,93	S8-1	6,35	B5-3	32,35	B15-4	13,16	BB9-1	7,89	M8-2	17,65
BB15-3	16,67	S17	0,00	BB4-1	31,37	BB18-2	13,16	M2-3	7,89	BB18-3	17,65
B9-2	16,67	S29	0,00	S37	29,41	BB15-6	13,16	B15-3	7,02	BB1-2	17,65

ملحق 4

النوع	رمز العينة	نسبة التلوث	المنطقة	الولاية
MEG	1	38	بنز قاصد علي	برج بوعريبيج
OFAN	4	62	عيون لعصافر	باتنة
WAHA	15	60	سطيف	سطيف
WAHA	16	44	سطيف	سطيف
WAHA	8	56	سطيف	سطيف

WAHA	9	20	واد طاقة	باتنة
WAHA	10	6	بيطام بريكة	باتنة
WAHA	17	10	بيطام بريكة	باتنة
WAHA	18	13	بابار	خنشلة
WAHA	19	9	بابار	خنشلة
WAHA	20	10	بابار	خنشلة
WAHA	21	70	ميلة	ميلة
WAHA	5	73	ميلة	ميلة
WAHA	22	71	ميلة	ميلة
WAHA	23	81	ميلة	ميلة
WAHA	24	38	سيدي مبارك	برج بو عريريج
WAHA	25	33	سيدي مبارك	برج بو عريريج
WAHA	26	41	سيدي مبارك	برج بو عريريج
GTA	27	22	مجانة	برج بو عريريج
GTA	28	49	الحمادية	برج بو عريريج
GTA	29	47	الحمادية	برج بو عريريج
GTA	3	35	ميلة	ميلة
GTA	30	40	ميلة	ميلة
GTA	31	33	ميلة	ميلة
GTA	32	19	بابار	خنشلة
GTA	33	13	بابار	خنشلة
GTA	34	23	بابار	خنشلة
GTA	11	71	مرقونة	باتنة
GTA	12	64	مرقونة	باتنة
GTA	35	76	مرقونة	باتنة
BOUS	7	78	باتنة	باتنة
BOUS	6	93	عيون لعصافر	باتنة
BOUS	36	90	واد طاقة	باتنة
BOUS	38	82	راس الماء	سطيف
BOUS	39	80	سطيف	سطيف
BOUS	40	85	سطيف	سطيف
BOUS	41	31	البرج	برج بو عريريج
BOUS	42	23	البرج	برج بو عريريج
BOUS	43	31	البرج	برج بو عريريج
MBB	13	58	عيون لعصافر	باتنة
MBB	14	68	عيون لعصافر	باتنة
MBB	37	60	عيون لعصافر	باتنة
MBB	44	41	سطيف	سطيف
MBB	45	32	سطيف	سطيف
MBB	46	47	عين عباسة	سطيف
MBB	2	30	سيدي مبارك	برج بو عريريج
MBB	47	54	عين ناسرة	برج بو عريريج
MBB	48	46	تكستار	برج بو عريريج
VIT	49	93	مسيلة أولاد منصور	برج بو عريريج
VIT	50	93	مسيلة أولاد منصور	برج بو عريريج
VIT	51	55	ميلة	ميلة
VIT	52	40	ميلة	ميلة
VIT	53	68	رجاص	ميلة
VIT	54	22	بابار	خنشلة
VIT	55	10	بابار	خنشلة
VIT	56	21	بابار	خنشلة
VIT	57	22	عين ناقة بسكرة	باتنة
VIT	58	30	الحوش بسكرة	باتنة
VIT	59	18	الحوش بسكرة	باتنة



First Report of *Fusarium chlamydosporum* Causing Crown Rot and Dumping off on Durum Wheat in Algeria

Amor Bencheikh ¹, Nouredine Rouag ^{2*}, Walid Boutalbi ³, Imene Belabed ⁴

- (1) Department of Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, Laboratory of applied Microbiology, Ferhat ABBAS University - Setif, Algeria
(2) Department of Agronomic Sciences, Faculty of Nature and Life Sciences, Laboratory of applied Microbiology Ferhat ABBAS University - Setif, Algeria (*) n.rouag@univ-setif.dz
(3) National Centre for Seeds and plants Certification (CNCC) Setif, Algeria
(4) Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences and Univers and Earth Sciences, BBA. Laboratory of applied Microbiology Ferhat ABBAS University – Setif, Algeria

Received: 11 January 2020

Accepted: 23 July 2019

Abstract

Several species of *Fusarium* infect durum wheat plants in the eastern part of Algeria. Endophytic fungus from random wheat seeds were sampled from fifty locations in eastern Algeria and shows the existence of *Fusarium chlamydosporum* regarding the macroscopic and microscopic characteristics. Molecular identification using EF1 and ITS1 primers were confirmed the presence of *Fusarium chlamydosporum* for the first time on durum wheat seeds in Algeria. The pathogenicity test was carried out on three durum wheat varieties for determining the effect of this isolate on the coleoptile and basal part of durum wheat. The results show that *F. chlamydosporum* had a negative impact on seed germination of the three varieties tested. Indeed, the reduction in germination varies between 85 and 92% reduction on GTAdur and Waha varieties, respectively. More, *F. chlamydosporum* caused a reduction in coleoptiles length in all varieties ranging from 60.97 to 70.05% in GTAdur and Waha, respectively. On the other hand, it showed a very different impact on plant growth parameters. Thus, the action was much more pronounced on reducing the root system length and the fresh weight of the vegetative system of Waha variety equal to 75.04 and 71.15%, respectively, and it is notable for the fresh weight of the root system of Bousselam variety. These very high levels of infectivity prompt us to reconsider our vision for this species of *Fusarium* in treatment and certification programs.

Key words: *Fusarium chlamydosporum*, Crown Rot, Dumping, Durum Wheat, Algeria

Introduction

Foods derived from wheat play an important role in the diet of the Algerian people. Bread, cakes, pasta and many other Algerian meals as couscous are the most common products made from wheat in Algeria (Kezih *et al.*, 2014). Wheat is grown throughout the different agro-ecological areas of Algeria, but it is essentially concentrated in semi-arid and arid areas (MADRP, 2016). *Fusarium* crown rot (FCR) also

known as (*Fusarium* foot and root rot) and *Fusarium* head blight (FHB) are two different diseases which affect small-grain cereals mainly wheat and barley (Leslie & Summerell, 2006; Scherm *et al.*, 2013).

FCR is an important disease which occurs on wheat worldwide; plants can be attacked in most growth stages. The symptoms of the disease differ according to the time of infection: early stage infections induce pre- or post-emergence mortality of the seedlings with the browning of the coleoptiles; later stage infections induce browning of the first two or three internodes. In serious attack, blighted heads are dispersed in the field, easily perceived when the wheat plants are still green (Fernandez & Jefferson, 2004; Balmas *et al.*, 2015).

FCR is one of high economic impact in different countries and regions of the world such as Australia, North America, South America, Europe, North Africa, South Africa and West Asia (Chakraborty *et al.*, 2006; Scherm *et al.*, 2013; Balmas *et al.*, 2015). FCR caused losses from 18 to 45.5% on wheat in the field in North West of Iran (Saremi *et al.*, 2007). Hollaway *et al.* (2013) have recorded crown rot yield losses of 8 to 36% in bread wheat and 24 to 52% in durum wheat in Australia. In Tunisia losses of 25% were recorded on durum wheat (Chekali *et al.*, 2013).

The severity of FCR is greater in dry soils and in areas with high temperatures (Scherm *et al.*, 2013; Obanor & Chakraborty, 2014; Balmas *et al.*, 2015). These conditions are present in many wheat-growing regions in Algeria. In addition, it has been reported that infection of the stem base of wheat with *Fusarium spp.* leads to the translocation of toxins to the ears and their accumulation in the grain (Covarelli *et al.*, 2012; Beccari *et al.*, 2018).

In Algeria, few studies were published on the *Fusarium* affecting wheat (Touati-Hattab *et al.*, 2016; Laraba *et al.*, 2017). This study was conducted to isolation and identification of some endophytic *Fusarium* species from seeds of durum wheat and to evaluate their pathogenicity.

Material and Methods

Isolation of endophytes

Random seeds samples were collected from fifty locations of eastern Algeria (one sample from each location), then transferred to the laboratory of applied microbiology (Ferhat Abbas University – Setif) where the isolation experiment was performed. The analysis of a seeds sample was carried out on a test sample corresponding to an approximate volume of 50ml, the analyzed seeds are randomly sampled from the sample received by a vigorous mixing. The seeds were superficially disinfected by using 1.5% of sodium hypochlorite for 10min, and then well drained, spread and placed to dry on sterilized filter paper for 20 to 30min under aseptic condition. A total of 100 seeds were cultured in 15 petri dishes (Between 6 to 7 seeds per dish) containing Potato Sucrose Agar (PSA) and incubated at 28 °C for 5-7 days. Fungi that gave white colour, beige and rose to reddish pigments in PSA and had spores that appeared similar to those of the genus *Fusarium*, when examined under the microscope, were purified (using the single-spore technique) and subsequently subject to macro and micro-morphological studies (LNPV, 2008).

Macroscopic characteristics

After purification, colonies obtained were conserved on potato dextrose agar (PDA). For macroscopic analysis, the colonies were then subculture on PDA and PSA. The characteristics studied were growth rates, colony appearance and texture, the pigmentation on both the top and reverse plates (Leslie & Summerell, 2006; Seddique *et al.*, 2010).

Microscopic characteristics

The carnation leaf agar (CLA) was used for diagnostic micro-morphological characteristics. Fresh, disease-free carnation leaves were cut into 1cm² pieces and oven-dried for 3 to 4h at 110 °C. Water agar (WA) at 15 g/L was prepared and sterilised, when pouring into plates, 4 or 5 pieces of carnation leaf fragments were placed, slightly spaced to each other, into the molten agar and the media left to cool. Mycelial tip fragments, of the purified cultures, were deposited onto dishes containing CLA and were incubated at 28 °C. After 10 to 15 days, a fragment of the agar culture was observed using light microscope (Seddique *et al.*, 2010).

The morphological identification was carried out by following that described in Burgess *et al.* (1994) and in Leslie & Summerell (2006), the diagnostic characteristics examined in the identification of species encompass the presence/absence of micro-, meso and macroconidia, their shapes and sizes (if present); the type of phialides (monophialide and/or polyphialide) and the occurrence or absence of chlamydospores, chains of microconidia and sporodochia on CLA.

Molecular identification

To confirm the identity of this fungus, the molecular identification was carried out by BIOfidal laboratory (CEDEX-France).

DNA extraction

DNA was extracted either from mycelium collected by scraping the surface of Petri plate cultures of purified isolate. 100µl lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM EDTA, 3% SDS and 1% 2-mercaptoethanol) was added and the nucleic acids were isolated according to the microwave mini-prep procedure described by (Goodwin and Lee, 1993). The final DNA pellet was supplemented into 100µl TE buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA) and stored at -20 °C until used.

PCR amplifications and gel electrophoresis

Partial sequences of the ITS region and the elongation factor (EF1) were polymerase chain reaction (PCR) amplified using fungal specific primer pair ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') (White *et al.*, 1990) and EF1-728F (5'CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG 3') (Carbone and Kohn, 1999). All amplification reactions were performed in a 50µl reaction volume containing 75mM Tris-HCl pH 9.0, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% (w/v) Tween 20, 1.5mM MgCl₂, 200µM each dNTP, 1 unit of thermo-stable DNA polymerase (GoTaq, Promega®) and 400nM of each relevant oligonucleotide primer. After electrophoresis in 1.2% Agarose gels in 0.5× TAE buffer (20mM Tris- acetate pH 8, 0.5mM EDTA), DNA was visualized by Ethidium bromide staining and UV illumination.

Purification of PCR products ITS1 and EF1

The combined PCR products are purified by mini-column centrifugation (NucleoSpin® Extract II) and the DNA binds in the presence of a chaotropic salt to a silica membrane. The binding mixture is loaded directly onto NucleoSpin® Extract II columns. Contaminations are removed by a simple washing step with ethanolic NT₃ buffer. The pure DNA is finally eluted under low ionic strength conditions with a slightly alkaline NE buffer (5mM Tris-Cl, pH 8.5).

DNA sequencing, alignment and Phylogenetic analysis

The sequences of EF1 and ITS1 regions of the test isolate thus obtained were next edited in order to generate a consensus sequence using the BioEdit Sequence Alignment Editor Software (<http://www.bioeditor.sdsc.edu/download.shtml>). Next, the most related corresponding sequences of the strain of *F. chlamydosporum* were selected from the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Multiple sequence alignments were performed in MEGA format by using the Clustal W option in MEGA-X software. Phylogenetic tree and distance matrix were also constructed using MEGA software,

which implemented the Neighbour-Joining (NJ) dendrogram program of Saitou & Nei (1987). The phylogenetic distance was founded on the model of Kimura 2-parameter (K2P) (Kimura, 1980).

Pathogenicity tests

The *Fusarium* isolate representative of the species *F. chlamydosporum* was screened for their pathogenicity. Two inoculation methods were used to assess the aggressiveness of *Fusarium* isolates on wheat cv. Bousselam, Waha and GTAdur the most commonly cultivated in east region of Algeria. The first method was by *in vitro* seed inoculation to study the effect on coleoptile growth compared to the uninoculated control. The second was used to assess aggressiveness on the crown by soil inoculation (Abdallah-Nekache *et al.*, 2019).

Pathogenicity of *Fusarium* on coleoptile emergence and growth

A modified method of Mesterhazy (1983) was adopted, where flasks containing 50ml of potato dextrose broth were inoculated by four plugs of 5mm diameter mycelia of a 7-day-old PDA cultures. The flasks were incubated in an orbital shaker running at 175rpm during 7 days. Mycelium was harvested by centrifugation (5000g for 10min), homogenized, and diluted to 13.3 mg/ml and homogenate with 0.2% of Tween 20 surfactant. Sterilized Whatman No.1 filter paper was placed on fresh PDA plates and 8ml of the homogenate mycelium were positioned on the filter paper; a second filter paper was placed on the top of the inoculum. Twenty-five wheat seeds (cv. Bousselam, Waha and GTAdur) were surface sterilized, dried and placed on each PDA plate and incubated at 25 °C for 4 days. Four replicates were used by *Fusarium* isolate. The coleoptile growth (mm) was measured after 4 days. Results were expressed as percentage of coleoptile emergence inhibition and percentage of coleoptile length reduction compared to uninoculated control seedlings.

Pathogenicity of *Fusarium* isolates on wheat crown

The pathogenicity assay on durum wheat crown was performed according to the protocol established by Khalifa & Matny (2013) with slight modifications. Initially, the *Fusarium* strains were grown on a substrate containing 54g of barley and 22ml of distilled water in 250ml Erlenmeyer and sterilized by autoclaving for 20 minutes at 120 °C. Subsequently, each Erlenmeyer flask was inoculated with 5 explants of 6 mm in diameter taken from a 7 days culture old of the *Fusarium* isolate and incubated at 25 °C for 15 days and shaken once every 3 to 4 days. Then each pot was sown with 5 seeds issue from one of the three durum wheat varieties (cv Bousselam, Waha and GTAdur) previously disinfected with sodium hypochlorite (2%). The seeds are sown to a depth of 4 to 5cm in sterilized soil. The artificial infection of the soil was obtained by spreading 2.5g of barley carrying a *Fusarium* strain at a depth of 2cm above the seeds and then covered with a layer of 2cm of sterilized soil. As control pots, three pots were sown only by seeds disinfected on sterile soil. Resulting in an adopted experimental device that is completely randomized with three repetitions where all pots were placed in an illuminated laboratory between 18 and 20 °C and 12h of natural light and 12h of darkness. To keep the plants in good growing conditions, frequent watering was done twice a week.

Plants were examined daily for signs of symptom onset throughout the 45 days of the experiment and the seedling emergence rate, root length, vegetative length, and Fresh weight of the root and vegetative system were measured.

Statistical analysis

Data were subjected to analyses of variance (ANOVA) with SPSS version 25. Significance of mean differences was determined using the Duncan test and responses were judged significant at the 5% level ($P=0.05$) with a 95% confidence interval.

Result and Discussion

Isolation of endophytic fungi

Close to 60 colonies of endophytic fungal species were obtained from durum wheat seeds, of which only 10 colonies showed reddish pigmentation and 5 other colonies showed beige to brown pigmentation on the PSA with strong indications as being a member of the *Fusarium* genus during preliminary observation.

Macroscopic characteristics

About the *Fusarium* FCh26 isolate, colony development on PDA media was relatively fast; 28 mm diameter colonies developed after only 3 days. The Mycelia are fluffy, compact, fairly dense, off white and turned soft colour with a shade of brown in older portions of the colony followed by golden yellow ring and a yellow-beige peripheral ring. The reverse cultures showed several shades of Persian red colour in the central ring followed by a small yellow-cake ring which is followed by a yellow-beige peripheral ring in the 7 days isolates (Figure 1).

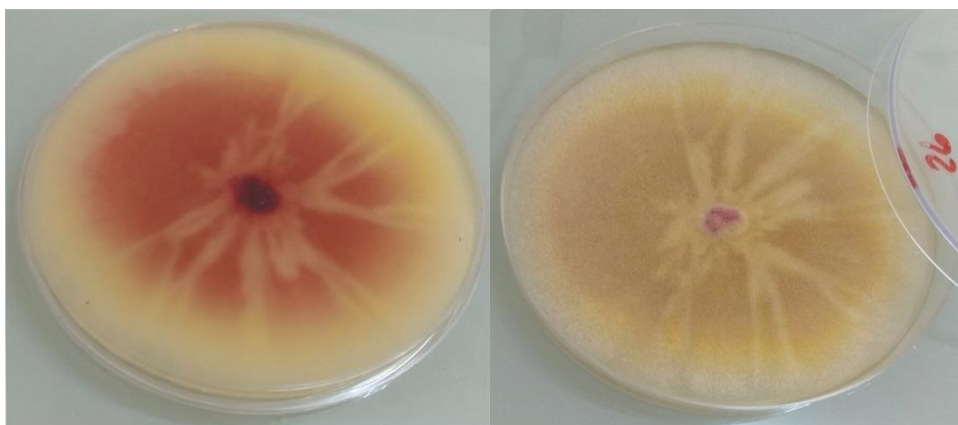


Figure 1. Macroscopic aspect of *F. chlamyosporum* colony cultures on PDA: **A** face and **B** reverse

Unlike the PDA media, the colony development on PSA media was fast with 52 mm diameter colonies developed after 3 days. The Mycelia are fairly dense, lavender and turned hibiscus (or carnation) colour with a shade of yellow in older portions of the colony with not well-defined concentric rings. The reverse cultures showed also not well-defined concentric rings with a greyish rose in peripheral area to burgundy colour in the centre, in the 7 days isolates old (Figure 2).

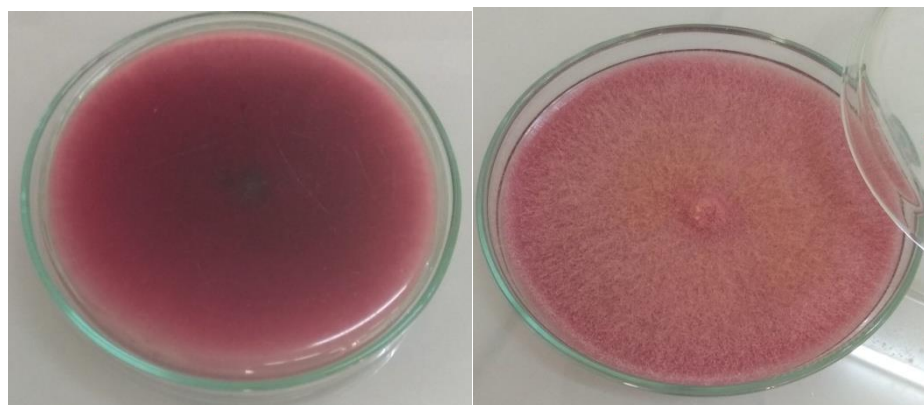


Figure 2. *F. chlamyosporum* colony cultures (observe and reverse) on PSA.

Microscopic characteristics

Generally, microconidia and mesoconidia were abundant, no sporodochia were observed even in 15-day old cultures. Conidiophores in the aerial mycelia were mainly short branched (Figure3). The macroconidia were rare, straight and falcate with 2-3 septa per conidium and microconidia were abundant with oval to obvate forms (Figure4). The isolate also produced primary conidia or mesoconidia with 1-2 septa, chlamydospores were rare and take a long time to be formed (15 days) in single or chain (Figure 5). Conidia were borne from both mono- and polyphialides (Figures 6). Chains of microconidia were absent even in 11-day old colonies.

One from 15 *Fusarium* strains isolated from durum wheat seeds (Waha) of Sidi-Mbarek locality in Bordj Bou Arreridj district were identified morphological putatively as the anamorph *Fusarium chlamydosporum* Wollenweber & Reinking (Leslie & Summerell, 2006).

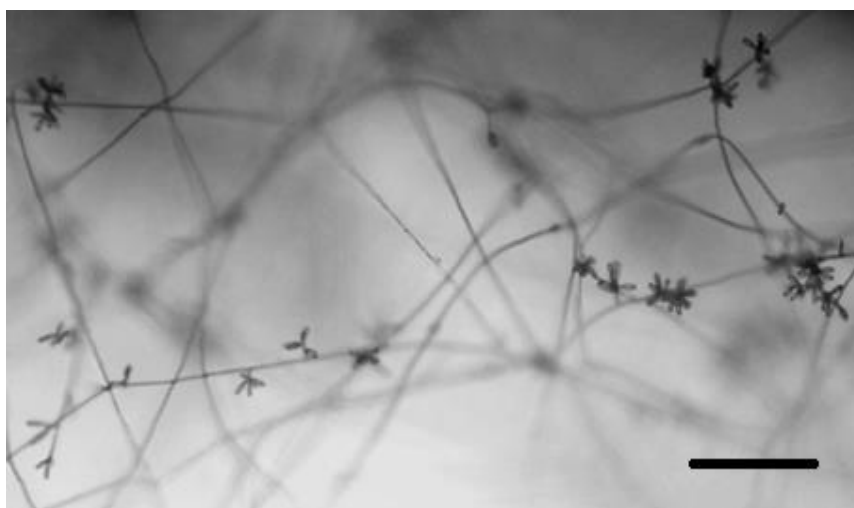


Figure 3. Simple polyphialidic conidiophores of *F. chlamydosporum* aerial mycelium. Scale bar = 50 μ m.

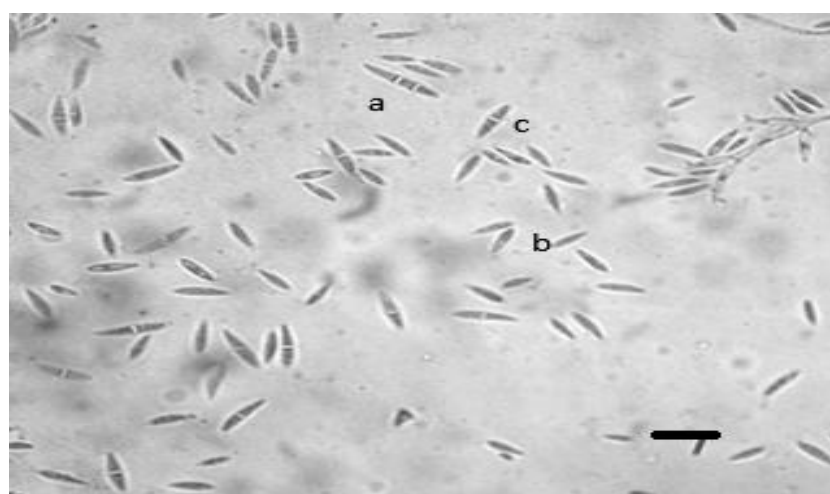


Figure 4. Different fructifications structures of *F. chlamydosporum* macroconidia (a), microconidia (b) and mesoconidia (c). Scale bar = 20 μ m.

Molecular identification and Phylogenetic analysis

After the amplification of the rDNA regions with primers EF1 and ITS1, the sequences used for the final phylogenetic analysis were 477 and 646b (Figure 7). After that, the two sequences obtained were compared to the referred sequences collected from the GenBank, similarities values of 97 to 100%. With ITS1 primer, the closest isolate to our isolate is *Fusarium chlamydosporum* isolate (CA116F1) with a similarity rate of 527 from 533b which represents a rate of 98.87% (Figure 8). However, with EF1 primer, the closest isolate to our isolate is *Fusarium nelsonii* strain with a similarity rate of 459 from 470b which represents a rate of 97.85%, followed by *Fusarium chlamydosporum* culture (ICMP: 10472) with a similarity rate of 447 from 470b which represents a rate of 97.22% (Figure 9).

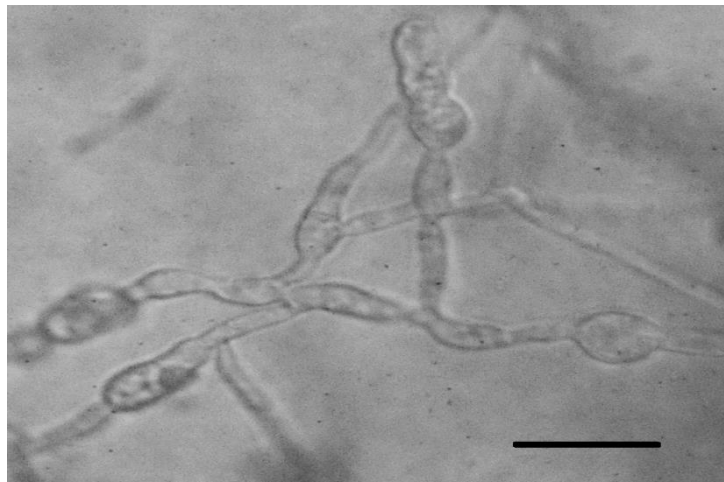


Figure 5. Chlamydospores of *F. chlamydosporum* in the aerial mycelium. Scale bar 20 μ m.

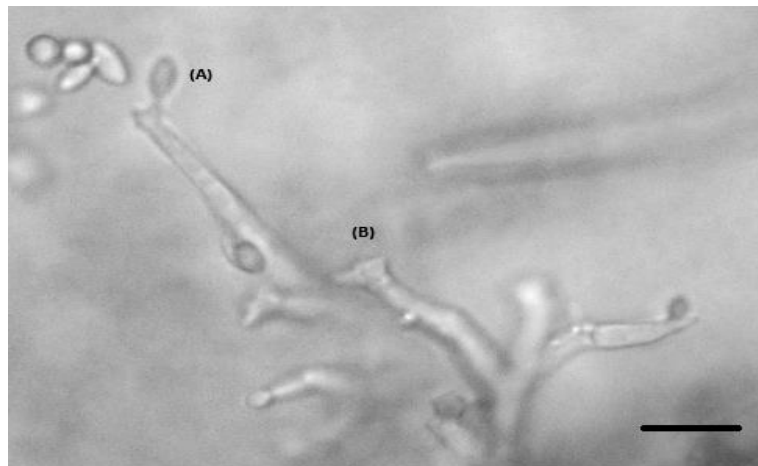


Figure 6. Mono (a) and polyphialidic (b) conidiophores of *F. chlamydosporum* in the aerial mycelium. Scale bar = 20 μ m.

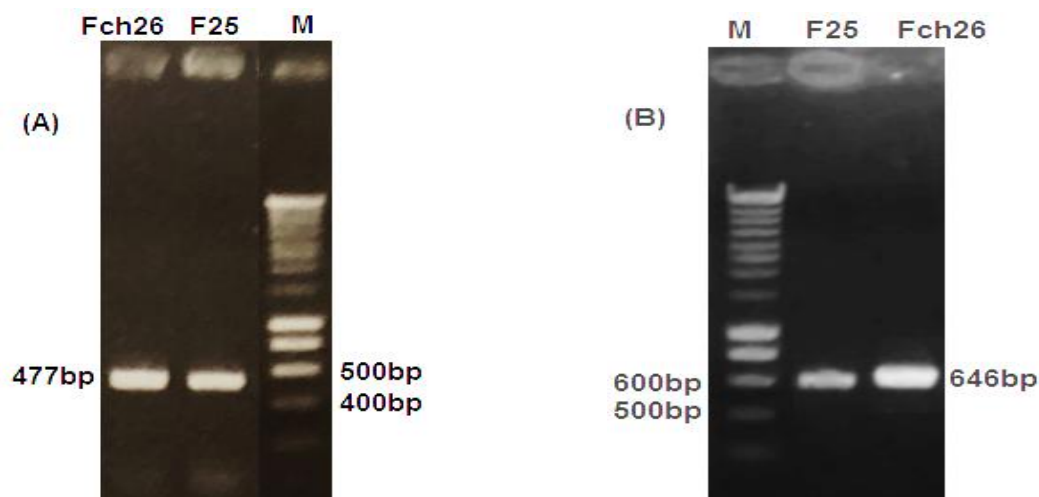


Figure 7. Agarose gel image of PCR-amplified ITS1 (A) and EF1 (B) gene region of *Fusarium* isolates from durum wheat.

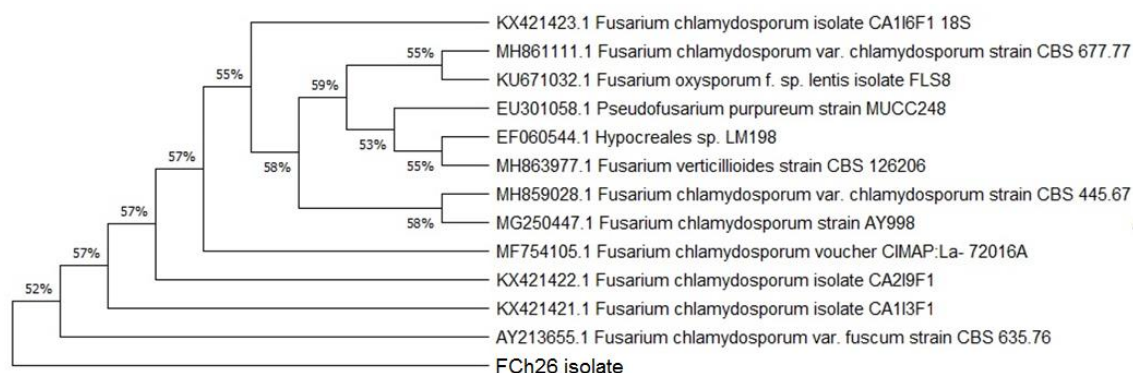


Figure 8. Phylogenetic relationships of *F. chlamydosporum* isolates inferred by Neighbour-Joining (NJ) analysis of ITS sequences.

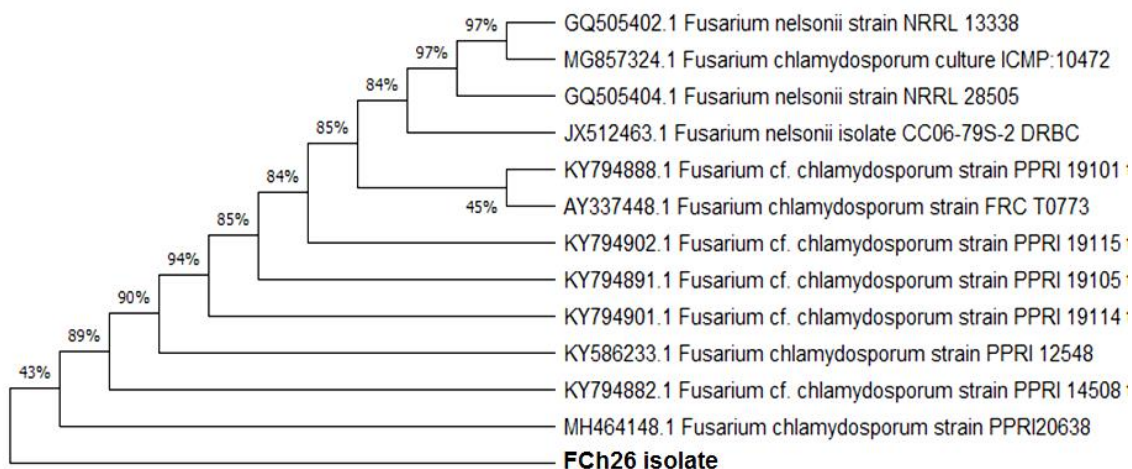


Figure 9. Phylogenetic relationships of *F. chlamydosporum* isolates inferred by Neighbour-Joining (NJ) analysis of EF sequences.

Pathogenicity tests

Effect of *Fusarium* isolates on coleoptile emergence and growth

The results of the *in vitro* test evaluated by the emergence inhibition and the length reduction of coleoptiles, after 4 days of incubation, have shown that the isolate of *F. chlamydosporum* was very aggressive. *F. chlamydosporum* induced 92%, 87% and 85% of coleoptile emergence inhibition on Waha, Boussemam and GTAdur varieties, respectively. However, *F. chlamydosporum* induced 70.47%, 69.45% and 58.01% of coleoptile length reduction on Waha, GTAdur and Boussemam varieties, respectively.

In terms of the behaviour of the three varieties of wheat to infection of *Fusarium* strain, it appears that the Waha variety was the most susceptible to attacks of the *Fusarium* strain with a germination reduction rate of 92%, the other two varieties, namely Boussemam and GTAdur, behave almost in a very similar way to *Fusarium* attacks with germination reduction rates of 87% and 85%, respectively (Table 1). However, the Waha and Boussemam varieties are more sensitive to the infection, with length reduction rate 70.05 and 70.49% respectively, compared to the GTA variety that had a reduction rate of 60,97% (Table 1). Following the obtained results, no significant difference in germination reduction and length reduction is given between the three wheat varieties tested ($p > 0,05$). On the other hand, the results illustrate that there is a very highly significant difference ($P < 0,001$) between artificially infected plants and uninfected control plants; this proves that our isolate is pathogenic at least on the germination and the length of the coleoptile (Figure 10).

Table 1. Results of the three pathogenicity tests on coleoptile emergence and growth

Wheat Variety	Fungus isolate	Col. length (cm)	Length reduction %	Num.germ_ Seeds	Germination reduction %
Boussemam	F.ch26	1.13	70.49 ^a	13	87 ^a
	Control	3.82	0	100	0
GTAdur	F.ch26	1.6	60,97 ^a	15	85 ^a
	Control	3.7	0	100	0
Waha	F.ch26	1.1	70.05 ^a	8	92 ^a
	Control	3.87	0	100	0

-Means with the same letter in the same column are significantly different at $P < 0.05$ as determined by Duncan test.

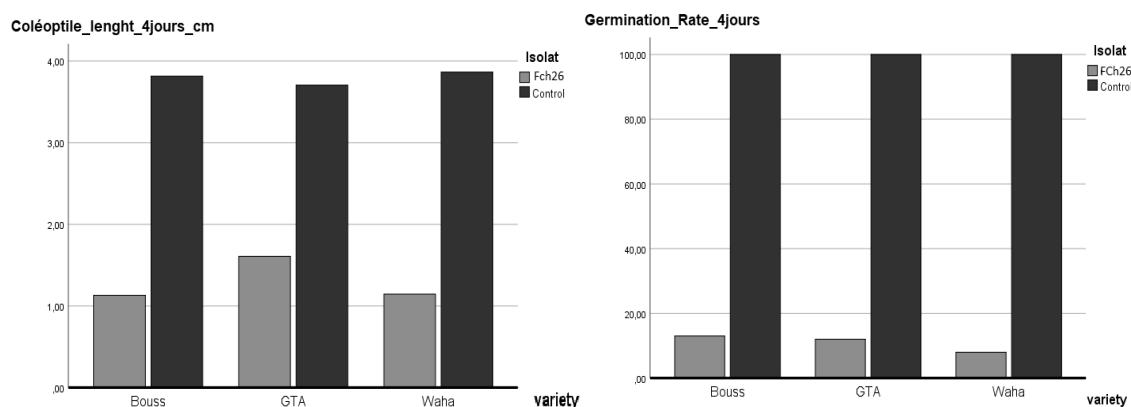


Figure 10. Impact of *F. chlamydosporum* on: (A) coleoptiles length and (B) germination rate after 4 days.

Pathogenicity on wheat crowns

It should be pointed out that artificially infected durum wheat plants with *F. chlamyosporum* isolate exhibit visible crown necrosis. The results indicate that the isolate of *F. chlamyosporum* affect both the seedling emergence rate (60% with the Waha variety), the length of the root and vegetative system (75.04% and 82.58% respectively, with Waha variety) and the fresh weight of the root and vegetative system (36.67% and 71.15% with Bousselam and Waha varieties, respectively) (Table 2).

Statistically, the results showed a very highly significant difference ($P < 0.001$) between the three varieties of durum wheat tested when it regards to the root system length. Indeed, the average length of the three varieties Bousselam, GTAdur and Waha varies from 11.75, 13.65 to 2.75cm respectively. The results showed also a highly significant difference ($p < 0.01$) between the three varieties of durum wheat tested when it regards to the length of the vegetative system. Indeed, the average of the length of the three varieties Bousselam, GTAdur and Waha varies from 14.33, 15.85 to 2.63cm respectively (Figure 11).

Otherwise, the results indicated a significant difference ($p < 0.05$) between the three durum varieties tested when it regards to the fresh weight of the vegetative system. Indeed, the average of the fresh weight of the three varieties Bousselam, GTAdur and Waha varies from 0.035, 0.042 and 0.015g respectively. This indicates a variable behavioral of durum wheat varieties when they are infected or not by the *F. chlamyosporum* (Table 2).

Finally, the results showed no significant difference ($p > 0.05$) between the three varieties of durum wheat tested when it comes to the fresh weight of the root system. Indeed, the average fresh weight of the three varieties Bousselam, GTAdur and Waha varies from 0.0195, 0.019 to 0.032g respectively. It is concluded that the three varieties of durum wheat used have a very similar behaviour, whether infected or not by this pathogenic fungus (Figure 11).

Table 2. Results of the pathogenicity test on wheat crown

Variety	Treatment	FWRS	% FWRS reduction	FWVS	% FWVS reduction	LRS	% LRS reduction	LVS	% LVS reduction
Bousselam	F.ch26	0.019 ^a	36.67	0.035 ^a	46.97	11.75 ^a	20.38	14.33 ^a	4.82
	Control	0.030	0.00	0.066	0.000	14.75	0.000	15.05	0.000
GTAdur	F.ch26	0.019 ^a	17.39	0.042 ^a	26.32	13.65 ^a	10.77	15.85 ^a	2.18
	Control	0.023	0.00	0.057	0.000	15.3	0.000	16.2	0.000
Waha	F.ch26	0.032 ^a	3.03	0.015 ^b	71.15	2.75 ^b	75.04	2.63 ^b	82.58
	Control	0.033	0.00	0.052	0.000	11.00	0.000	15.11	0.000

FWRS: Fresh weight root system; **FWVS:** Fresh weight vegetative system; **LRS:** Length root system; **LVS:** Length of vegetative system; **LVS:** Length of vegetative system. Means with the same letter in the same column are significantly different at $P < 0.05$ as determined by Duncan test.

The results showed a very highly significant difference between the fungus tested and the control when it regards to the length of the vegetative ($p < 0.001$) and a highly significant difference when it regards to the fresh weight of vegetative and root systems ($p < 0.05$). On the other hand, the results showed no significant effect ($p > 0.05$) between the fungus tested and the control when it comes to the fresh weight of the root system. This proves that the fungus is pathogenic, at least along the length of the root and vegetative system and the fresh weight of the vegetative system but not on the fresh weight of the root system (Figure 11).

For the symptoms observed are either observed in the vegetative system that are necrosis (observed at the collar) and yellowing that usually end in the mortality of the plants, or symptoms observed in the

root system that are a necrosis on several parts of the roots and a less developed root system with weak branching related with short roots (short length) compared to root length of controls (Figure 11).

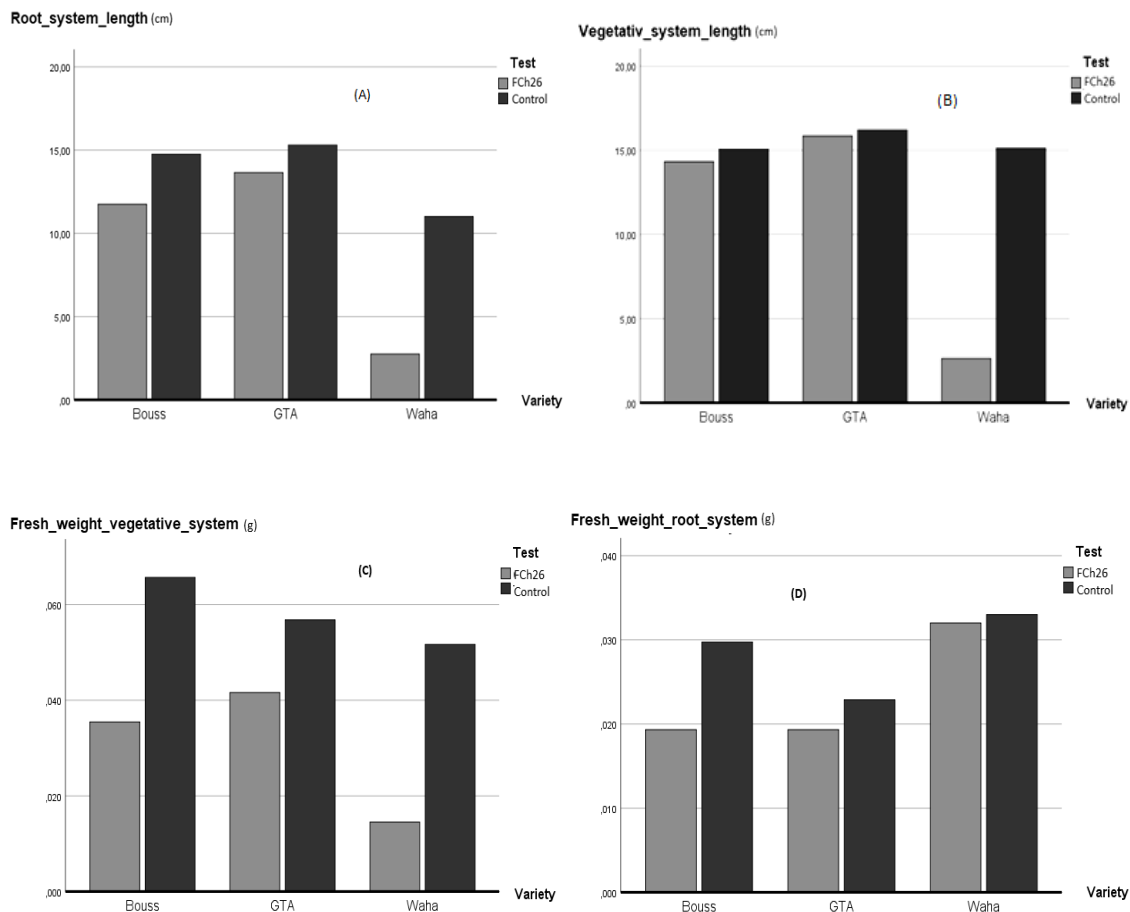


Figure 11. Impact of *F. chlamyosporium* on: (A) root system length, (B) vegetative system length, (C) vegetative system fresh weight and (D) root system fresh weight.

The anamorphic genus *Fusarium* is a phytopathogenic fungus with a worldwide distribution, able of infecting a large range of agricultural crops like orchid, maize or barley and wheat plants, and also decrease quality and yield of the grain (Seddique *et al.*, 2010).

Many species of the genus *Fusarium* are causing the most serious diseases affecting root and head of wheat plant and in all growing stages, still has not been adequate investigated in Algeria (Abdellah-Nekkach *et al.*, 2019).

Traditionally, species of *Fusarium* have been separated and described based on morphological and cultural characteristics, such as pigment production, presence colour of mycelia, phialides, macro-, micro and meso-conidia shape-size, sporodochia and chlamyospores (Burgess *et al.*, 1994; Lesli & Summerell, 2006). Cultural methods coupled with morphological details from microscopy, are among the techniques used and assign one to detect exactly which taxon is present (identification). These methodologies are easy, fast and consistent in the given putative species name, however, have limitations which impede a proper assessment.

In this study, a *Fusarium* isolate previously identified on the basis of morphological characteristics as *F. chlamyosporum* was confirmed by molecular sequencing using the gene sequences of the ITS1 and EF1 regions of the rDNA.

The phylogenetic analysis, showed that this isolate gave the same gene sequence to each other (97-99% of similarity) and to the referred *F. chlamydosporum* strains (AY213655 and AY337448, Lesli & Summerell, 2006) (88,74 and 84,98% of similarity) from NCBI.

Few researches are conducted on the pathogenicity of *F. chlamydosporum* (especially on durum wheat) which makes it difficult to compare our results with other researches. However, *F. chlamydosporum* can affect other plants species like guava (*Psidium guajava* L.) (Gupta & Misra, 2012) and *Coleus forskohlii* (Singh *et al.*, 2009). Lazreg *et al.* (2014) reported that *F. chlamydosporum* can affect the Aleppo-pine seedlings and cause a root growth inhibition, germination reduction and vegetative system length reduction with 51.94%, 52% and 47.24% respectively. Those results are considered smaller than ours obtained with wheat waha variety, and greater only for vegetative system length comparing to GTAdur and Bousselem varieties. Njeru *et al.* (2016), reported that *F. chlamydosporum* was the most prevalent in crop residues sampled from wheat fields (24%).

Our results showed that *F. chlamydosporum* was very pathogenic on wheat plant, especially if it was compared with *F. graminearum* and *F. culmorum* which they are considered the responsible of crown rot and FHB of wheat plant (Wu *et al.*, 2005; Abdallah-Nekkach *et al.*, 2019). Hudec (2007), reported that *F. culmorum* and *F. graminearum* were the most severe pathogens towards coleoptile development of wheat and barley, the coleoptile length reduction was 91,32% with *F. culmorum* and 78.32% with *F. graminearum*, these results are not far from ours (coleoptile length reduction), which confirm the high pathogenicity of *F. chlamydosporum*.

In research on the mycotoxins produced by *F. chlamydosporum*, Savard *et al.* (1990) reported that the latter could produce a new mycotoxin in addition to the mycotoxin listed in other researches, such as trichothecene and neosolaniol monoacetate, isolated from a single-spore culture of *F. chlamydosporum* by Lansden and his colleagues in 1978, he named this new mycotoxin the Chlamydosporol. O'Donnell *et al.* (2018) has been reviewed that the *F. chlamydosporum* can produce a several mycotoxine like moniliformin (MON), beauvericin (BEA) and butenolide (BUT).

These mycotoxins can affect the severity of affection on both coleoptile emergence and length, root system length and weight and finally vegetative system length and weight, this may be due to the fact that the mycotoxin inhibit production of plant protein and enzymes responsible for stimulating host plant defences (Khalifah & Matny, 2013), Studies have also shown that increasing the amount of the fungal toxin, increases the pathogenesis of the fungus, either by its effect on protein synthesis within plant cells or by stimulating the plant to produce hydrogen peroxide which stimulates programmed cell death (Burlakoti *et al.* 2007; Aleandri *et al.* 2007; Desmond *et al.* 2008).

This study identified *Fusarium chlamydosporum* for the first time on durum wheat in Algeria and highlighted its pathogenicity on the three varieties of durum wheat, namely Waha, Bousselem and GTAdur. This pathogenicity was materialized through the drastic reduction of seeds germination and coleoptile length of durum wheat. It has also affected negatively some growth parameters like the length and fresh weight of root and vegetative systems.

References

- Abdallah-Nekache, N., Laraba, I., Ducos, C., Barreau, C., Bouznad, Z. & Bouregghda, H. 2019. Occurrence of *Fusarium* head blight and *Fusarium* crown rot in Algerian wheat: identification of associated species and assessment of aggressiveness. *European Journal of Plant Pathology*, 154: 499–512.

- Aleandri, M. P., Magro, P. & Chilosi, G. 2007. Modulation of host pH during the wheat *Fusarium culmorum* interaction and its influence on the production and activity of pectolytic enzymes. *Plant Pathology*, 56: 517-525.
- Balmas, V., Scherm, B., Marcello, A., Beyer, M., Hoffmann, L., Migheli, Q. & Pasquali, M. 2015. *Fusarium* species and chemotypes associated with *Fusarium* head blight and *Fusarium* root rot on wheat in Sardinia. *Plant Pathology*, 64: 972-979.
- Beccari, G., Prodi, A., Pisi, A., Nipoti, P., Onofri, A., Nicholson, P., Pfohl, K., Karlovsky, P., Gardiner, D. M. & Covarelli, L. 2018. Development of three *Fusarium* crown rot causal agents and systemic translocation of deoxynivalenol following stem base infection of soft wheat. *Plant Pathology*, 67: 1055–1065.
- Burlakoti, R. R., Estrada, R.J., Rivera, V.V., Boddada, A., Secor, G.A. & Adhikari, T.B. 2007. Real-time PCR quantification and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* in wheat inoculated with isolates collected from potato, sugar beet, and wheat. *Phytopathology*, 97: 835- 841.
- Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P. & Backhouse, D. 1994. *Laboratory Manual for Fusarium Research*, 3rd ed. Department of Crop Science, University of Sydney, Sydney.
- Carbone, I. & Kohn, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553-556.
- Chakraborty, S., Liu, C. J., Mitter, V., Scott, J., Akinsanmi, O. A., Ali, S., Dill-Macky, R., Nicol, J., Backhouse, D. & Simpfendorfer, S. 2006. Pathogen population structure and epidemiology are keys to wheat crown rot and *Fusarium* head blight management. *Australasian Plant Pathology*, 35: 643 – 655.
- Chekali, S., Gargouri, S., Berraies, S., Nicol, M. J. & Nasraoui, B. 2013. Impact of *Fusarium* foot and root rot on yield of cereals in Tunisia. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 8: 75–86.
- Covarelli, L., Beccari, G., Steed, A., and Nicholson, P. 2012. Colonization of soft wheat following infection of the stem base by *Fusarium culmorum* and translocation of deoxynivalenol to the head. *Plant Pathology*, 61: 1121-1129.
- Desmond, O.J., Manners, J.M., Stephens, A.E., Maclean, D.J., Schenk, P.M., Gardiner, D.M., Munn, A.L. & Kazan, K. 2008. The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defense responses in wheat. *Molecular Plant Pathology*, 9: 435-445.
- Fernandez, M. R. & Jefferson, G. 2004. Fungal populations in roots and crowns of common and durum wheat in Saskatchewan. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26: 325-334.
- Goodwin, D.C. Lee, S.B. 1993. Microwave mini prep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques*, 15: 438-444.
- Gupta, V.K. & Misra, A.K. 2012. *Fusarium chlamyosporum*, causing wilt disease of guava (*Psidium guajava* L.) in India, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45: 2425-2428.
- Hollaway, G. J., Evans, M. L., Wallwork, H., Dyson, C. B., and Mc Kay, A. C. 2013. Yield loss in cereals, caused by *Fusarium culmorum* and *F. pseudograminearum*, is related to fungal DNA in soil prior to planting, rainfall, and cereal type. *Plant Disease*, 97: 977-982.
- Hudec, K. 2007. Pathogenicity of fungi associated with wheat and barley seedling emergence and fungicide efficacy of seed treatment. *Biologia, Bratislava*, 62: 287-291.
- Kezih, R., Bekhouche, F. & Merazka, A. 2014. Some traditional Algerian products from durum wheat. *African Journal of Food Science*, 8: 30–34.
- Khalifah, M. & Matny, O. 2013. Pathogenicity evaluation of *Fusarium spp* isolates, causal agent of crown rot disease in wheat. *The Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 44: 480-489.

- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Appl. Environ. Microbiol*, 16: 11-120.
- Lansden, J. A., Cole, R. J., Dorner, J. W., Cox, R. H., Cutler, H. G. & Clark, J. D. 1978. A new trichothecene mycotoxin isolated from *Fusarium tricinctum*. *J Agric Food Chem*, 26: 246-249.
- Laraba, I., Boureghda, H., Abdallah, N., Bouaicha, O., Obanor, F., Moretti, A., Geiser, D. M., Kim, H. S., McCormick, S. P., Proctor, R. H., Kelly, A. C., Ward, T. J. & O'Donnell, K. 2017. Fungal population genetic structure and mycotoxin potential of the wheat crown rot and head blight pathogen *Fusarium culmorum* in Algeria. *Fungal Genetics and Biology*, 103, 34–41.
- Lazreg, F., Belabid, L., Sanchez, J., Gallego, E. & Bayaa, B. 2014. Pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with diseases of Aleppo-pine seedlings in Algerian forest nurseries. *Journal of Forest Science*, 60: 115–120.
- Leslie, J. F. & Summerell, A. B. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing. Ames, USA.
- LNPV: Laboratoire National de la Protection des Végétaux. 2008. Toutes céréales, détection et identification des espèces de *Fusarium spp* et *Microdochium nivale* sur grains de céréales par isolement mycologique semi-sélectif et étude microbiologique. Réf. MH-03.16 : version B.
- MADRP. 2016. Statistiques agricoles. Ministère de l'agriculture et du développement durable et de la pêche. Alger, Algérie.
- Mesterhazy, A. 1983. Breeding wheat for resistance to *Fusarium graminearum* and *F.culmorum*. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 91:295–311.
- Njeru, N.K., Muthomi, J.W., Mutegi, C.K. & Wagacha, J.M. 2016. Effect of cropping systems on accumulation of *Fusarium* head blight of wheat inocula in crop residues and soils. *Journal of Plant Sciences*, 11: 12-21.
- Obanor, F. & Chakraborty, S. 2014. Aetiology and toxigenicity of *Fusarium graminearum* and *F.pseudograminearum* causing crown rot and head blight in Australia under natural and artificial infection. *Plant Pathology*, 63: 1218–1229.
- O'Donnell, K., McCormick, S.P., Busman, M., Proctor, R.H., Ward, T.J., Doehring, G., Geiser, D.M., Alberts, J.F. & Rheeder, J.P. 2018. Marasas *et al.* 1984 “Toxicogenic *Fusarium* Species: Identity and Mycotoxicology” revisited. *Mycologia*, 6: 1058-1080.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Saremi, H., Ammarellou, A. & Jafary, H. 2007. Incidence of crown rot disease of wheat caused by *Fusarium pseudograminearum* a new soil born fungal species in North West Iran. *Pakistan Journal Biological Sciences*, 10: 3606–3612.
- Savard, M.E., Marc, E., Miller, D.J., Salleh, B. & Strange, R. 1990. Chlamydosporol, a new metabolite from *Fusarium chlamydosporum*. *Mycopathologia*, 110: 177-181.
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M. & Migheli, Q. 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology*, 14: 323–341.
- Seddique, S., Yusuf, U. & Zainudi, N. 2010. Morphological and molecular detection of *Fusarium chlamydosporum* from root endophytes of *Dendrobium crumenatum*. *African Journal of Biotechnology*, 9: 4081-4090.
- Singh, R., Parameswaran, T.N., Prakasa Rao, E.V.S., Puttanna, K., Kalra, A., Srinivas, K.V.N.S., Bagyaraj D.J. & Divya, S. 2009. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and *Pseudomonas fluorescens* on root-rot and wilt, growth and yield of *Coleus forskohlii*. *Biocontrol Science and Technology*, 19: 835-841.

- Touati-Hattab, S., Barreau, C., Verd al-Bonnin, M. N., Chereau, S., Richard-Forget, F., Hadjout, S., Mekliche, L., and Bouznad, Z. 2016. Pathogenicity and trichothecenes production of *Fusarium culmorum* strains causing head blight on wheat and evaluation of resistance of the varieties cultivated in Algeria. *European Journal of Plant Pathology*, 145: 797-814.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322, In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (Eds) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego.
- Wu, A.B., Li, H.P., Zhao, C.S. & Liao, Y.C. 2005. Comparative pathogenicity of *Fusarium graminearum* isolates from China revealed by wheat coleoptile and floret inoculations. *Mycopathologia*, 160: 75-83.



اولین گزارش از *Fusarium chlamydosporum* عامل پوسیدگی طوقه و مرگ گیاهچه گندم دوروم در الجزایر

آموربنشیش^۱، نورالدین رواق^{۲*}، ولید بوطلیبی^۳، ایمن بلابد^۴

(۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم طبیعی و زیستی، دانشگاه فرهنگت عباس، سطیف، الجزایر

(۲) گروه علوم زراعی، دانشکده علوم طبیعی و زیستی، دانشگاه فرهنگت عباس، سطیف، الجزایر، n.rouag@univ-setif.dz (*)

(۳) مرکز ملی گواهی بذر و گیاه، سطیف، الجزایر

(۴) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم طبیعی و زیستی، دانشگاه فرهنگت عباس، سطیف، الجزایر

چکیده

در قسمت شرقی الجزایر گندم دوروم را چندین گونه از *Fusarium* آلوده می‌کنند. در ۵۰ نقطه در شرق الجزایر به طور تصادفی از قارچ‌های اندوفیت بذور گندم نمونه‌برداری شد و بر اساس ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی وجود گونه *F. chlamydosporum* اثبات گردید. بررسی ملکولی با استفاده از آغازگرهای EF1 و ITS1 وجود قارچ *F. chlamydosporum* را برای اولین بار در بذور گندم دوروم در الجزایر ثابت کرد. آزمون بیماریزایی به منظور بررسی اثر این جدایه بر روی کولتوپتیل و بخش پایینی در سه رقم گندم دوروم انجام شد. نتایج نشان داد که قارچ *F. chlamydosporum* بر روی جوانه زنی بذور این سه رقم تحت بررسی اثر منفی داشت. در واقع، کاهش جوانه زنی بذور دوروم بین ۸۵ و ۹۲ درصد در ارقام GTAdur و Waha متغیر بود. به علاوه، قارچ *F. chlamydosporum* به ترتیب باعث کاهش طول ۶۰/۹۷ تا ۷۰/۰۵ درصدی در طول کولتوپتیل رقم‌های GTAdur و Waha شد. از طرف دیگر، تأثیر بسیار متفاوتی در پارامترهای رشد گیاه مشاهده گردید. بدین ترتیب که اثر قارچ بر کاهش طول ریشه و وزن اندام رویشی سبز رقم Waha به ترتیب ۷۵/۰۴ و ۷۱/۱۵ درصد بود و در مورد وزن تر ریشه رقم Bousselam مقدار قابل توجهی بود. این سطوح بالای آلودگی موجب می‌شود تا در برنامه‌های تیماری و صدور گواهی بذور در مورد این گونه از فوزاریوم تجدید نظر گردد.

واژه‌های کلیدی: *Fusarium chlamydosporum*، پوسیدگی طوقه، گندم دوروم، الجزایر



First report of *Fusarium equiseti* causing crown rot and damping-off on durum wheat in Algeria

Amor Bencheikh , Nouredine Rouag , Walid Mamache & Imene Belabed

To cite this article: Amor Bencheikh , Nouredine Rouag , Walid Mamache & Imene Belabed (2020): First report of *Fusarium equiseti* causing crown rot and damping-off on durum wheat in Algeria, Archives of Phytopathology and Plant Protection, DOI: [10.1080/03235408.2020.1804303](https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1804303)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1804303>



Published online: 08 Aug 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)




View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



First report of *Fusarium equiseti* causing crown rot and damping-off on durum wheat in Algeria

Amor Bencheikh^a , Nouredine Rouag^b, Walid Mamache^c and Imene Belabed^d

^aDepartment of Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, Laboratory of applied Microbiology, Ferhat ABBAS University, Setif, Algeria; ^bDepartment of Agronomic Sciences, Faculty of Nature and Life Sciences, Laboratory of applied Microbiology, Ferhat ABBAS University, Setif, Algeria; ^cDepartment of Biochemistry, Faculty of Nature and Life Sciences, Laboratory of applied phytotherapy to chronic diseases, Ferhat ABBAS University, Setif, Algeria; ^dDepartment of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences and Universe and Earth Sciences, BBA. Laboratory of Applied Microbiology, Ferhat ABBAS University, Setif, Algeria

ABSTRACT

The isolation of Pathogens from wheat seeds sampled from fifty-nine locations in North-eastern Algeria showed the existence of the species *Fusarium equiseti* for the first time in the seeds of the durum wheat in Algeria. The identification was carried out on the basis of macroscopic and microscopic characteristics and confirmed by Molecular identification. The pathogenicity test was performed, on three durum wheat varieties to determine the impact of this isolate on the coleoptile and basal part of durum wheat. The results showed that *Fusarium equiseti* caused a significant diminution in length and emergence rate of coleoptile by 48.99 and 44% respectively, and a decrease in the length of the root and vegetative systems by 45.63 and 27.12%, consecutively. It also caused a diminution in the fresh weight of the root and vegetative systems by 45.65 and 22.52%, respectively.

ARTICLE HISTORY

Received 23 January 2020
Revised 10 May 2020
Accepted 22 July 2020

KEYWORDS

Fusarium equiseti; crown rot; damping-off; durum wheat; Algeria

Introduction

Cereals are the most important food source in the world, both for direct human consumption and, indirectly, as inputs for animal production (CIC 2017). Wheat occupies a privileged place in Algerian agriculture because of its strategic importance in human and animal nutrition; For example, it is used in production of bread and other Algerian meals like couscous which is the most popular foods in Algeria (Kezih et al. 2014). Unfortunately, the wheat plant is the target of several species of *Fusarium* genus; that colonize the rhizosphere of wheat (Hmissi et al. 2011).

CONTACT Amor Bencheikh  benchomar@univ-setif.dz  Department of Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, Laboratory of applied Microbiology, Ferhat ABBAS University, Setif, Algeria

Among the most important disease which affect small-grain cereals (mainly wheat and barley) we find two different diseases that are *Fusarium* crown rot (FCR) and *Fusarium* head blight (FHB) (Leslie and Summerell 2006; Scherm et al. 2013). FCR, also known as foot rot, is a severe disease of wheat, characterized by necrosis and dry rot of the crown, root tissues and stem base (Beccari et al. 2018). This disease is a prolonged problem where dry and high temperature climatic conditions are present; unfortunately, as the case in many wheat-growing areas in Algeria (Chakraborty et al. 2006; Obanor and Chakraborty 2014; Abdallah-Nekache et al. 2019).

This disease is a serious problem causing a decrease in durum wheat grain yield by the abortion of flowers and the decrease in the number and weight of grains (yield reduction up to 61%) and alteration of grain quality (production of mycotoxins that can translocate to the head and accumulate in the grain) in most of the cultivated areas of this crop (Bai and Shaner 1994; Matny 2015; Beccari et al. 2018). Several researchers have reported that FCR was found in North Africa countries. In Tunisia, 25% of losses were recorded (Chekali et al. 2013; Rebib et al. 2014) and in Morocco the losses were between 12 and 17% (Qostal et al. 2019), while in Algeria no statistics about yield losses were available (Abdallah-Nekache et al. 2019); In addition, the researches about the causal agent of *Fusarium* foot rot of durum wheat, in this country, are still insufficient (Larab et al. 2017); besides, the species *F. equiseti* was not mentioned, in all this researches, as cause of this disease in durum wheat. Moya-Elizondo et al. (2011) concluded, in his research on the prevalence of FCR, that *F. equiseti* was the most present in wheat plant residue (55%), compared to other species of *Fusarium*. However, Smiley and Yan (2009) considered this species to be less pathogenic and their effects on wheat crops are not well characterized. This study was conducted to isolate and identify some endophytic *Fusarium* species from random seeds of durum wheat from the North-eastern of Algeria and to evaluate their pathogenicity.

Material and methods

Plant material

Fifty-nine durum wheat seed samples were provided by the CNCC (National Center for Seeds and Plants Certification and Control) of Setif state, after the harvest season (2015–2016). The samples were taken from several states in the North-eastern of Algeria, including: Setif, Bordj Bou-Arredj, M'sila, Batna, Khenchela, Biskra and Mila. The varieties of wheat samples collected were GTAdur, Ofanto, Vitron, Waha, Bousslam,

Megress and Mohamed Ben-Bachir. The samples were stored at 4 °C until further use in the applied microbiology laboratory, where the study was conducted.

Isolation of endophytes

The isolation of endophytes from durum wheat seeds was done using the method proposed by the National Laboratory of Plant Protection, France (NPPL 2008). The analysis of a seeds sample was carried out on a test sample corresponding to an approximate volume of 50 ml, the analyzed seeds were randomly sampled from the sample received by a vigorous mixing. The seeds were superficially disinfected by using 1.5% of sodium hypochlorite for 10 min, and then well drained, spread and placed to dry on sterilized filter paper for 20 to 30 min under aseptic condition. A total of 100 seeds were cultured in 15 petri dish (6 to 7 seeds per dish) containing Potato Sucrose Agar (PSA) and incubated at 28 °C for 5–7 days.

Fungi that gave white color, beige to brownish-white and rose to red-dish or pigments in PSA and had spores that appeared similar to those of the genus *Fusarium*, when examined under the microscope, were purified (using the single-spore technique) and subsequently subjected to macro and micro-morphological studies (NPPL 2008).

Macroscopic and microscopic characteristics

After purification, the obtained colonies were conserved on potato dextrose agar (PDA). For macroscopic analysis, the colonies were subcultured on PDA and PSA. The studied characteristics were the growth rates, the colony appearance and the texture, in addition to the pigmentation on both the top and reverse plates (Leslie and Summerell 2006; Seddique et al. 2010).

The carnation leaf agar (CLA) was used for the diagnosis of micro-morphological characteristics according to the method described by Seddique et al. (2010). Mycelial tip fragments, from the purified cultures, were deposited onto dishes containing CLA and were incubated at 28 °C. After 10 to 15 days, a fragment of the agar culture was observed using light microscope.

The morphological identification was accomplished by using the synoptic keys for *Fusarium* species identification determined by Burgess et al. (1994) and Leslie and Summerell (2006). The diagnostic characteristics used in the identification of species include the presence/absence of micro-, meso and macroconidia, their shapes and sizes (if present); the type of phialides (monophialide and/or polyphialide) and the occurrence

or absence of chlamydo-spores, chains of microconidia and sporodochia on CLA.

Molecular identification

To confirm the identity of the isolated fungus, the molecular identification was carried out by BIOfidal laboratory (CEDEX-France), as follows:

DNA extraction

DNA was extracted from mycelium collected by scraping the surface of petri dishes cultures of purified isolate. 100 µl lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM EDTA, 3% SDS and 1% 2-mercaptoethanol) was added and the nucleic acids were isolated according to the microwave mini-prep procedure described by Goodwin and Lee (1993). The final DNA pellet was supplemented into 100 µl TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA) and stored at -20°C until used.

PCR amplifications and gel electrophoresis

Partial sequences of the elongation factor (EF1) were amplified through polymerase chain reaction (PCR) using fungal specific primer pair EF1-728F (5'CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG 3') (Carbone and Kohn 1999). All amplification reactions were performed in a 50 µl reaction volume containing 75 mM Tris-HCl pH 9.0, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% (*w/v*) Tween 20, 1.5 mM MgCl_2 , 200 µM each dNTP, 1 unit of thermostable DNA polymerase (GoTaq, Promega) and 400 nM of each relevant oligonucleotide primer. After electrophoresis in 1.2% agarose gels in $0.5\times$ TAE buffer (20 mM Tris-acetate pH 8, 0.5 mM EDTA), DNA was visualized by Ethidium bromide staining and UV illumination.

Purification of PCR product EF1

The combined PCR products were purified by mini-column centrifugation (NucleoSpin® Extract II) and the DNA binds in the presence of a chaotropic salt to a silica membrane. The binding mixture was loaded directly onto NucleoSpin® Extract II columns. Contaminations were removed by a washing step with ethanolic NT3 buffer. Finally, the pure DNA was eluted under low ionic strength conditions with a slightly alkaline NE buffer (5 mM Tris-Cl, pH 8.5).

DNA sequencing, alignment and phylogenetic analysis

The sequence of EF1 region thus obtained was next edited to generate a consensus sequence using the *BioEdit* Sequence Alignment Editor Software (<http://www.bioeditor.sdsc.edu/download.shtml>). Next, the most related corresponding sequences of the strain of *F. equiseti* were selected from the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Multiple sequence alignments were performed in MEGA format by using the *Clustal W* option in MEGA-X software. Phylogenetic tree and distance matrix were also constructed using *MEGA* software, which implemented the Neighbour-Joining (NJ) dendrogram program of Saitou and Nei (1987). The phylogenetic distance was founded on the model of Kimura 2-parameter (K2P) (Kimura 1980).

Pathogenicity tests

The Feq28 isolate was screened for its pathogenicity. Two inoculation methods were used to assess the aggressiveness of the *Fusarium* isolate on wheat cv. Bousselam, Waha and GTAdur the most commonly cultivated in North-eastern region of Algeria. The first method was by *in vitro* seed inoculation to evaluate the effect on coleoptiles growth compared to the noninoculated control. The second was by soil inoculation to assess the aggressiveness on the basal part (Abdallah-Nekache et al. 2019).

Pathogenicity of *Fusarium* isolate on coleoptile emergence and growth

A modified method of Mesterhazy (1983) was adopted where flasks containing 50 ml of potato dextrose broth (PDB) were inoculated by four plugs of 5 mm diameter mycelia of a 7-day-old PDA cultures. The flasks were incubated in an orbital shaker running at 175 rpm for 7 days. Mycelium was harvested by centrifugation (5000 g for 10 min), homogenized, diluted to 13 mg/ml and finally 0.2% of Tween 20 surfactant was added. Sterilized filter paper was placed on fresh PDA dishes, then, 8 ml of the homogenized mycelium were added on the filter paper; a second filter paper was placed on the top of the inoculum. Twenty-five wheat seeds (cv. Bousselam, Waha and GTAdur) were surface sterilized, dried and placed on each PDA plate (Four dishes for each wheat variety) and incubated at 25 °C for 4 days. The coleoptile growth (mm) was measured after 4 days. Results were expressed as percentage of coleoptile emergence inhibition and percentage of coleoptile length reduction compared to noninoculated control.

Pathogenicity of *Fusarium* isolate on wheat crown

The pathogenicity assay on wheat crown was performed according to Khalifa and Matny (2013), with slight modification. The *Fusarium* strain was grown on a barley base substrate, where 250 ml Erlenmeyer received 54 g and 22 ml of distilled water, followed by sterilization and autoclaving for 20 minutes at 120 °C. The Erlenmeyer was inoculated with 5 explants of 6 mm in diameter taken from 7-day old culture of the *Fusarium* isolate and incubated at 25 °C for 15 days and shaken once every 3 to 4 days. Seeds (cv. Bousselam, Waha and GTA dur) were previously disinfected with sodium hypochlorite (2%) and sown at a rate of 5 seeds per pot with a depth of 4 to 5 cm in previously autoclaved soil. The artificial infection of the soil was made by adding 2.5 g of barley carrying the *Fusarium* strain at a depth of 2 cm above the seeds and then covered with a 2 cm layer of sterilized soil. As control, three pots were sown only by seeds disinfected in sterile soil. Resulting in an adopted experimental device that is completely randomized with three repetitions where all pots were placed in an illuminated laboratory (12 h of natural light) between 18 and 20 °C. To maintain the plants in good growing conditions, frequent watering was done twice a week. The plants were examined daily to visualize any symptoms during all the experiment duration (45 days). The seedling emergence rate, length of the root and vegetative system and the fresh weight of the root and vegetative system was measured.

Statistical analysis

Data were subjected to analyses of variance (ANOVA) with SPSS version 25. Significance of mean differences was determined using the Duncan test at 5% level ($p = 0.05$) with 95% confidence interval.

Results

Isolation of endophytes

About 55 fungal endophytes isolates were obtained from durum wheat seeds but only one gave beige to brownish-white color on PSA with strong signs that it is a member of *Fusarium equiseti* in the preliminary noticing.

Macroscopic characteristics

One isolate (Feq28) was suspected to be *Fusarium equiseti*. The colony development on PDA media was slow (17.5 mm diameter colonies

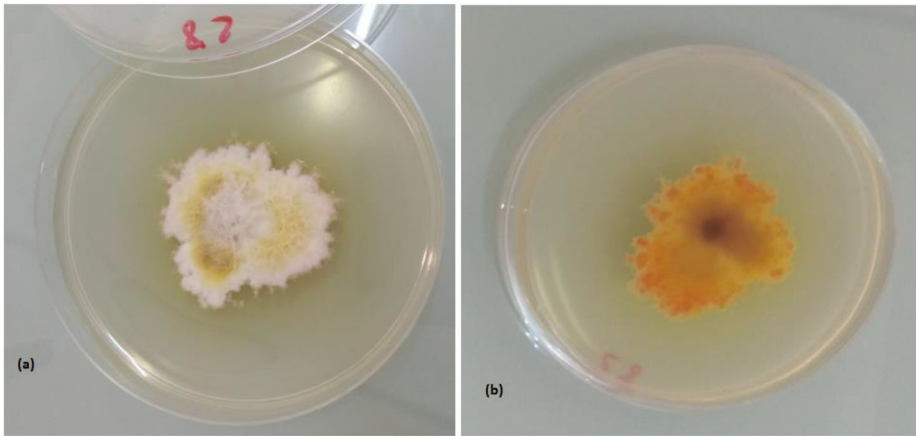


Figure 1. Macroscopic aspect of *F. equiseti* (Feq28) colony cultures on PDA: (a) face and (b) reverse.

developed after 3 days). The mycelium was dense, white at first and become, as the culture ages, golden to brown at the center of the colony. This isolate also formed a pale to dark brown pigment when it is in contact with the agar. The reverse cultures showed a duck-foot to cheddar color (Figure 1).

Unlike the PDA media, the colony development on PSA media was fast (compared to PDA media) with 39.5 mm diameter colonies developed after 3 days. The mycelium was dense, white at first and become beige to brown at the center of the colony as the culture ages. The reverse of the cultures showed a graduation of brown from the center to the edges of the culture (Figure 2).

Microscopic characteristics

On CLA medium, abundant macroconidia form in light orange sporodochia were observed. The macroconidia are thick-walled and have strong dorsiventral curvature and usually are 5 to 7 septate, with a distinctly foot-shaped basal cell and a tapering apical cell. Macroconidial length varies from 25 to 55 μm (Figure 3a). Macroconidia are formed from monophialides conidiophores (Figure 4).

Microconidia are absent but chlamydo spores are formed relatively rapidly on CLA, they are abundant with very prominent thick, roughened walls, and are produced singly, in clumps or chains (Figure 3b).

Finally, one isolate obtained from durum wheat seeds (GTAdur) of Al-Hamadia in Bordj Bou-Arreridj were identified morphologically as the anamorph *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc (Leslie and Summerell 2006).

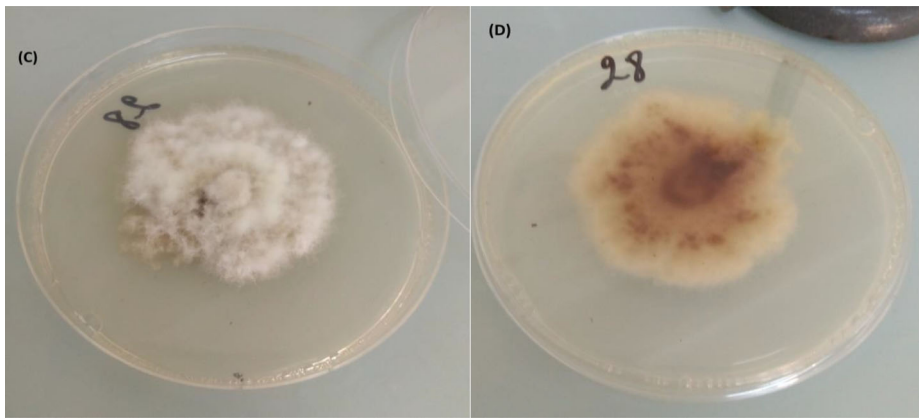


Figure 2. Macroscopic aspect of *F. equiseti* (Feq28) colony cultures on PSA: (C) face and (D) reverse.

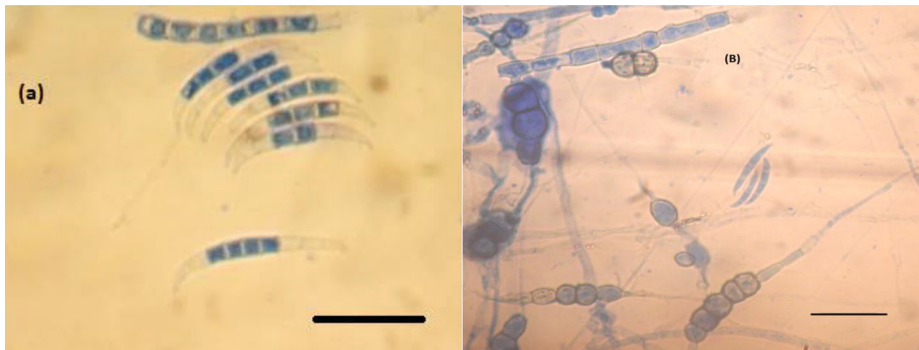


Figure 3. Macroconidia (a) and Chlamydospore (b) of *F. equiseti* (Feq28). Scale bar = 50 μ m.

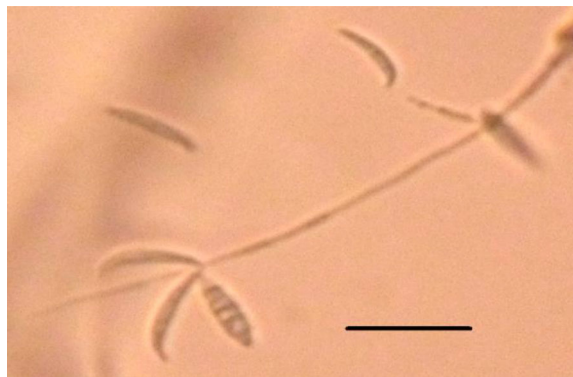


Figure 4. Monophialidic conidiophores of *F. equiseti* in the aerial mycelium. Scale bar = 50 μ m.

Molecular identification and phylogenetic analysis

After the amplification of the rDNA regions with EF1 primer, the sequence used for the final phylogenetic analysis was 458b (Figure 5).

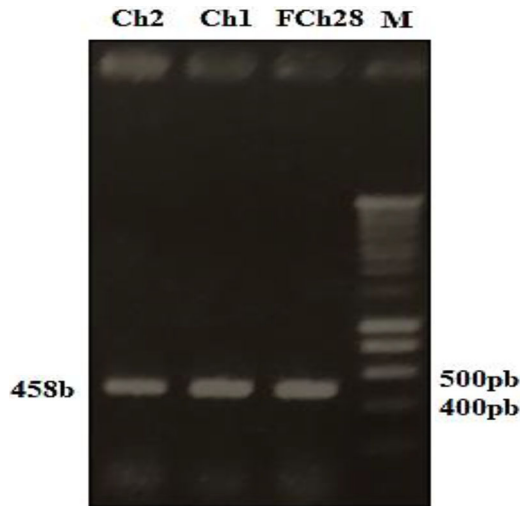


Figure 5. Agarose gel image of PCR-amplified EF1 gene region of Feq28 isolates from durum wheat.

After that, the test sequence was compared to the referred sequences collected from the GenBank. The closest isolate to our isolate (Feq28), was *Fusarium equiseti* isolate (R17) with a similarity rate of 447 from 448 bases which represents a rate of 99.78% (Table 1).

The phylogenetic analysis showed that the isolate Feq28 was grouped with many reference isolates of the species *F. equiseti* (Figure 6). Based on these results, the isolate was confirmed to be *F. equiseti*. After identification, the isolate was named as *Fusarium equiseti* Feq28 and the sequence was submitted to GenBank under the accession no: MT263681.

Pathogenicity tests

Effect of Fusarium isolate on coleoptile emergence and growth

In vitro, the isolate (Feq28) was responsible for 44%, 23% and 18% of coleoptile emergence inhibition on Waha, GTAdur and Bousselam varieties, respectively. Furthermore, it induced 48.99%, 41.59% and 34.99% of coleoptile length reduction on Bousselam, Waha and GTAdur varieties, consecutively. In terms of the behavior of the three varieties of wheat following the infection of *Fusarium* strain after 4 days of incubation, it appears that the Bousselam and Waha varieties were more sensitive to the infection with a length reduction rate of 48.99 and 41.59% respectively compared to the GTAdur variety which had a decrease rate of 34.99%. However, it appears that the Waha variety was the most susceptible to attacks of the *Fusarium* strain with a germination reduction rate of 44% compared to the GTAdur and Bousselam varieties which had a germination reduction rate of 23 and 18% respectively (Table 2).



Table 1. The comparison of the DNA sequence of Feq28 isolate (obtained with EFT1) to the referred sequences collected from the Genbank (NCBI).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Per. ident	Accession
Fusarium equiseti isolate R17 translation elongation factor 1-alpha (EFTa) gene, partial cds	821	821	97%	0.0	99.78%	MH401556
Fusarium equiseti isolate XJ-QT-F19-11 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	821	821	97%	0.0	99.78%	KT224323
Fusarium equiseti isolate XJ-QT-F17-11 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	821	821	97%	0.0	99.78%	KT224321
Fusarium cf. incarnatum/equiseti GC-2014 isolate F941 translation elongation factor 1-alpha (EFT1) gene, partial cds	821	821	97%	0.0	99.78%	KF962942
Fusarium equiseti strain CBS 131255 elongation factor 1a (tef1) gene, partial cds	821	821	97%	0.0	99.78%	JQ429335
Fusarium clavum strain CBS 131787 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	815	815	97%	0.0	99.55%	MN170461
Fusarium clavum strain CBS 131448 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	815	815	97%	0.0	99.55%	MN170459
Fusarium clavum strain CBS 119881 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	815	815	97%	0.0	99.55%	MN170457
Fusarium clavum strain CBS 126202 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	815	815	97%	0.0	99.55%	MN170456

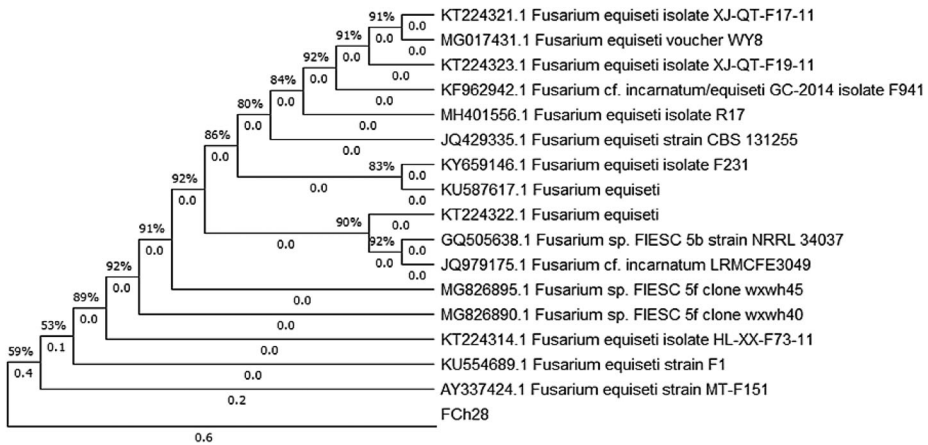


Figure 6. Phylogenetic relationships of *F. equiseti* isolates (Feq28) inferred by Neighbour-Joining (NJ) analysis of EF sequences.

Table 2. Results of the pathogenicity test on coleoptile emergence and growth.

Wheat variety	Treatment	Coleoptile length (cm)	Coleoptile length reduction (%)	Number of germinated seeds	Germination reduction (%)
Bousselam	Feq28	1.93	48.99	82	18
	Control	3.82	0	100	0
GTAdur	Feq28	2.4	34.99	77	23
	Control	3.7	0	100	0
Waha	Feq28	2.26	41.59	56	44
	Control	3.87	0	100	0

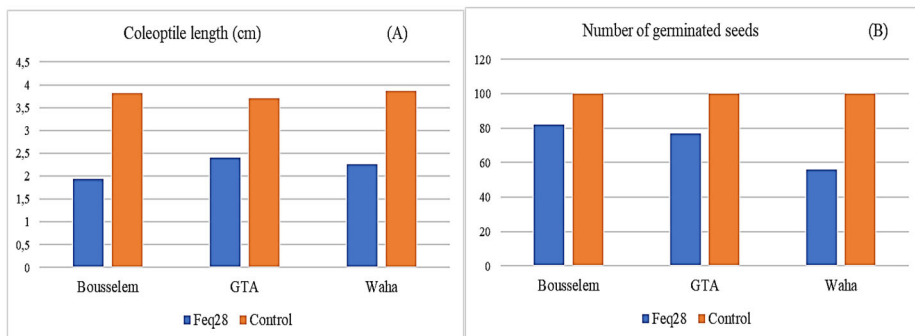


Figure 7. Impact of *F. equiseti* on: (A) coleoptiles length and (B) Number of germinated seeds.

Statistical analysis of the results, showed no significant difference in germination and length reduction was seen between the three wheat varieties tested ($p > 0.05$). On the contrary, the results showed that there was a highly significant difference ($p < 0.001$) between artificially infected plants and uninfected control plants. This result demonstrate that our isolate was very pathogenic on the germination and the length of the coleoptile (Figure 7).

Pathogenicity on wheat crowns

The results displayed that the isolates of *F. equiseti* affect both the length of the root and vegetative system (45.63% and 27.12% of root and vegetative length reduction respectively, in variety GTAdur and Waha) in addition to the fresh weight of the root and vegetative system (22.52% and 45.65% of root and vegetative fresh weight reduction respectively, in variety Waha and GTAdur) (Table 3).

Statistically, the results revealed no significant difference ($p > 0.05$) between the three varieties of durum wheat tested with all the studied parameters. On the other hand, the results showed a significant difference ($p < 0.05$) between the Feq28 isolate and the control regarding the length of the root and vegetative system and when it comes to the fresh weight of root system. In contrast, the results showed no significant difference ($p > 0.05$) between the Feq28 isolate and the control concerning the fresh weight of the vegetative system. This proved that our isolate was pathogenic, at least, for the length of both the root and the vegetative system and along with the fresh weight of root system (Figure 8).

Regarding symptoms on the vegetative system, a necrosis in the collar and yellowing that usually ends in plant deaths, were observed. While, on root system, a necrosis on several parts of the roots and a less developed root system (weak branching associated with short roots) were noted, compared to the controls.

Discussion

The anamorphic genus *Fusarium* is known for its pathogenicity towards many plants, including wheat and barley. Also, it can cause serious damage on yield and quality of the grain (Matny 2015). Pathogenic species of the genus *Fusarium* that causes the most serious diseases affecting root, stem and head of wheat plant, and in all growing stages, still has not been studied well in Algeria (Abdallah-Nekache et al. 2019).

Morphologically, the isolate Feq28 was previously identified as *F. equiseti*. The results of the macroscopic characterization (growth rate, type and color of the mycelium) and those of the microscopic characterization (shape and size of both macroconidia and chlamydo spores, type of conidiophore) were very similar to those obtained by Dharanendra Swamy et al. (2020) With a slight difference concerning to the formation method of chlamydo spores. Moreover, our results were very similar to those obtained by both Yezli et al. (2019) and Lazreg et al. (2014), except that the number of septa and the length of macroconidia were slightly different. However, the morphological identification, which was based on pigment production, colour of mycelia, type of phialides; type,

Table 3. Results of the three pathogenicity tests on wheat crown.

Variety	Treatment	% FWRS		% FWVS		% LRS		% LVS	
		(g)	reduction	(g)	reduction	(cm)	reduction	(cm)	reduction
Bousselam	FCh28	0.027	12.77	0.052	19.59	9.86	33.62	15.77	1.5
	Control	0.032	0.00	0.065	0.0	14.85	0.0	16.01	0.0
GTA	FCh28	0.025	1.32	0.033	45.65	8.12	45.63	12.89	19.7
	Control	0.026	0.00	0.061	0.0	14.93	0.0	16.06	0.0
Waha	FCh28	0.029	22.52	0.039	13.14	9.24	27.13	11.5	27.12
	Control	0.037	0.00	0.046	0.0	12.68	0.0	15.78	0.0

Fresh weight root system: FWRS; Fresh weight vegetative system: FWVS; Length root system: LRS; Length vegetative system: LVS.

shape and size of conidia, is an approximate method to identify the species (Gave the putative name only) because of the similarities between the species of the same genus. Therefore, the use of molecular identification is essential to obtain a very accurate identification (Seddique et al. 2010).

For this purpose, the gene sequence of the EF1 region of the rDNA was examined. The phylogenetic analysis showed that this isolate gave the closest gene sequence to *Fusarium equiseti* isolate (R17) with a similarity rate of 99.78%, which confirms the result of the morphological identification.

F. equiseti is a plant pathogen predominant worldwide infecting a wide range of plant hosts (Lahuf et al. 2018), such as *Pisum sativum* and *Cicer arietinum* (Goswami et al. 2008), *Vigna unguiculata* (Rodrigues and Menezes 2005), *Pinus halepensis* (Lazreg et al. 2014), *Cuminum cyminum* (Ramchandra and Bhatt 2012) and *Brassica oleracea* var. *botrytis* (Li et al. 2017).

Few researches were conducted on the pathogenicity of *F. equiseti* on durum wheat (especially quantitative studies about the effect on the coleoptile, roots and seedlings) which makes it difficult to compare our results with other researches.

The obtained results showed that the Feq28 isolate had a moderate aggressiveness toward wheat coleoptile, root and seedling which is in concordance with the finding of Muthomi et al. (2008), they concluded that *F. equiseti* can be classified as a fungus with moderate or weak pathogenicity. The Feq28 isolate was of moderate pathogenicity on wheat plant, especially if it compared with *F. graminearum* and *F. culmorum* which are considered responsible for FCR and FHB of wheat plant (Wu et al. 2005; Abdallah-Nekache et al. 2019). Hudec (2007), reported that *F. culmorum* and *F. graminearum* were the most severe pathogens towards coleoptile development of wheat and barley, the coleoptile length reduction was 91.32% with *F. culmorum* and 78.32% with *F. graminearum*, These results are far from our obtained results (coleoptile length reduction) which confirms the moderate pathogenicity of our isolate (Feq28).

Furthermore, *F. equiseti* is able to produce numerous kinds of toxic secondary metabolites, which leads to both phyto- and cytotoxicity

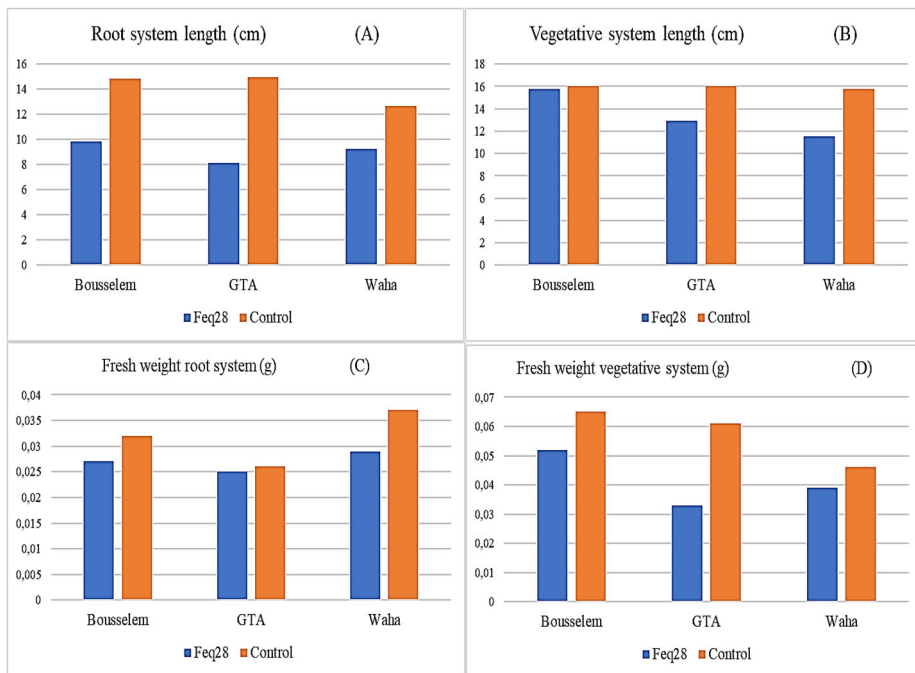


Figure 8. Impact of *F. equiseti* on: (A) root system length, (B) vegetative system length, (C) fresh weight root system and (D) fresh weight vegetative system.

(Langseth et al. 1998; Morrison et al. 2002). Fusarochromanone, fusarenon-X and zearalenone (ZEA) were the most common secondary metabolites from natural populations of *F. equiseti* (Stępień et al. 2012). Goswami and his colleagues (2008) reported, in a research conducted on the pathogenicity and the mycotoxins produced by *F. equiseti*, that the diseased tissues from several affected plant species contained the mycotoxins nivalenol and/or zearalenone. These mycotoxins can affect severely coleoptile emergence and length, root system length and weight and, finally, vegetative system length and weight. This may be due since the mycotoxins inhibits the production of plant protein and enzymes responsible for the stimulation of the host plant defenses (Khalifah and Matny 2013). Studies have also shown that increasing the amount of the fungal toxin increases the pathogenesis of the fungus, either by affecting the protein synthesis within plant cells or by stimulating the plant to produce hydrogen peroxide which stimulates programmed cell death (Aleandri et al. 2007; Burlakoti et al. 2007; Desmond et al. 2008).

Conclusion

This study identified *Fusarium equiseti* for the first time on durum wheat seeds in Algeria and highlighted its pathogenicity on the three varieties

of durum wheat, namely Waha, Bouselam and GTAdur. The pathogenicity was materialized through the reduction of seeds germination and coleoptile length of durum wheat. *Fusarium equiseti* has also affected negatively some growth parameters like the length and fresh weight of root and vegetative systems.

Acknowledgements

We thank very much, Mr. Director of the National Center for Seed and Plant Certification (NCSPC) Setif, Algeria, for the assistance and facilities provided.

Disclosure statement

All authors declare that they have no conflict of interest.

ORCID

Amor Bencheikh  <http://orcid.org/0000-0002-8300-938X>

References

- Abdallah-Nekache N, Laraba I, Ducos C, Barreau C, Bouznad Z, Bouregghda H. 2019. Occurrence of *Fusarium* head blight and *Fusarium* crown rot in Algerian wheat: identification of associated species and assessment of aggressiveness. *Eur J Plant Pathol.* 154(3):499–512.
- Aleandri MP, Magro P, Chilosi G. 2007. Modulation of host pH during the wheat *Fusarium culmorum* interaction and its influence on the production and activity of pectolytic enzymes. *Plant Pathol.* 56(3):517–525.
- Bai GH, Shaner GE. 1994. Scab of wheat: prospects for control. *Plant Dis.* 78:760–766.
- Beccari G, Prodi A, Pisi A, Nipoti P, Onofri A, Nicholson P, Pfohl K, Karlovsky P, Gardiner DM, Covarelli L. 2018. Development of three *Fusarium* crown rot causal agents and systemic translocation of deoxynivalenol following stem base infection of soft wheat. *Plant Pathol.* 67(5):1055–1065.
- Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP, Backhouse D. 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research. 3rd ed. Sydney: Department of Crop Science, University of Sydney.
- Burlakoti RR, Estrada RJ, Rivera VV, Boddada A, Secor GA, Adhikari TB. 2007. Real-time PCR quantification and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* wheat inoculated with isolates collected from potato, sugar beet, and wheat. *Phytopathology.* 97(7):835–841.
- Carbone I, Kohn LM. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia.* 91(3):553–556.
- Chakraborty S, Liu CJ, Mitter V, Scott J, Akinsanmi OA, Ali S, Dill-Macky R, Nicol J, Back House D, Simpfendorfer S. 2006. Pathogen population structure and epidemiology are keys to wheat crown rot and *Fusarium* head blight management. *Austral Plant Pathol.* 35(6):643–655.

- Chekali S, Gargouri S, Berraies S, Nicol MJ, Nasraoui B. 2013. Impact of *Fusarium* foot and root rot on yield of cereals in Tunisia. *Tunis J Plant Prot.* 8:75–86.
- CIC (Conseil International des Céréales). 2017. Rapport sur Marché des céréales. Conference Cereals. Londres - 6 juin. GMR 477.
- Desmond OJ, Manners JM, Stephens AE, Maclean DJ, Schenk PM, Gardiner DM, Munn AL, Kazan K. 2008. The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defense responses in wheat. *Mol Plant Pathol.* 9(4):435–445.
- Dharanendra Swamy S, Mahadevakumar S, Hemareddy HB, Amruthesh KN, Mamatha S, Kunjeti SG, Swapnil R, Vasantha Kumar T, Lakshmidevi N. 2020. First report of *Fusarium equiseti*—the incitant of post flowering stalkrot of maize (*Zea mays* L.) in India. *Crop Prot.* 129:105035.
- Goodwin DC, Lee SB. 1993. Microwave mini prep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques.* 15:438–444.
- Goswami RS, Dong Y, Punja ZK. 2008. Host range and mycotoxin production by *Fusarium equiseti* isolates originating from ginseng fields. *Can J Plant Pathol.* 30(1): 155–160.
- Hmissi I, Gargouri S, Sifi B. 2011. Attempt of wheat protection against *Fusarium culmorum* using Rhizobium isolates. *Tunis J Plant Prot.* 6:75–86.
- Hudec K. 2007. Pathogenicity of fungi associated with wheat and barley seedling emergence and fungicide efficacy of seed treatment. *Biologia.* 62(3):287–291.
- Kezih R, Bekhouche F, Merazka A. 2014. Some traditional Algerian products from durum wheat. *Afr J Food Sci.* 8(1):30–34.
- Khalifah M, Matny O. 2013. Pathogenicity evaluation of *Fusarium* spp isolates, causal agent of crown rot disease in wheat. *Iraqi J Agric Sci.* 44(4):480–489.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Appl Environ Microbiol.* 16:11–120.
- Lahuf A, Hade O, Al-Mosoy M, Hameed Z, Li J. 2018. First record of the crown rot fungus *Fusarium equiseti* affecting *Triticum aestivum* L. and *Aptenia cordifolia* in Iraq. *Asian J Agric Biol.* 6:543–548.
- Langseth W, Bernhoft A, Rundberget T, Kosiak B, Gareis M. 1998. Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia.* 144(2):103–113.
- Larab I, Bouregghda H, Abdallah N, Bouaicha O, Obanor F, Moretti A, Geiser DM, Kim HS, Mc Cormick SP, Proctor RH, et al. 2017. Population genetic structure and mycotoxin potential of the wheat crown rot and head blight pathogen *Fusarium culmorum* in Algeria. *Fungal Genet Biol.* 103:34–41.
- Lazreg F, Belabid L, Sanchez J, Gallego E, Garrido-Cardenas JA, Elhaitoum A. 2014. First report of *Fusarium equiseti* causing damping-off disease on Aleppo pine in Algeria. *Plant Dis.* 98(9):1268.
- Leslie JF, Summerell AB. 2006. *The Fusarium laboratory manual.* Ames: Blackwell Publishing, USA; p. 388.
- Li P, Shi Y, Guo M, Xie X, Chai A, Li B. 2017. *Fusarium* wilt of cauliflower caused by *Fusarium equiseti* in China. *Can J Plant Pathol.* 39(1):77–82.
- Matny ON. 2015. *Fusarium* head blight and crown rot on wheat & barley: losses and health risks. *Adv Plants Agric Res.* 2(1):38–43.
- Mesterhazy A. 1983. Breeding wheat for resistance to *Fusarium graminearum* and *F. culmorum.* *Zeitschrift Für Pflanzenzüchtung.* 91:295–311.

- Morrison E, Rundberget T, Kosiak B, Aastveit AH, Bernhoft A. 2002. Cytotoxicity of trichothecenes and fusarochromanone produced by *Fusarium equiseti* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia*. 153(1):49–56.
- Moya-Elizondo EA, Rew LJ, Jacobsen BJ, Hogg AC, Dyer AT. 2011. Distribution and prevalence of *Fusarium* crown rot and common root rot pathogens of wheat in Montana. *Plant Dis*. 95(9):1099–1108.
- Muthomi JW, Ndung'u JK, Gathumbi J, Mutitu E, Wagacha M. 2008. The occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Kenyan wheat. *Crop Prot*. 27(8):1215–1219.
- NPPL: National Plants Protection laboratory (Laboratoire National de la Protection des Végétaux) 2008. Toutes céréales, détection et identification des espèces de *Fusarium spp* et *Microdochium nivale* sur grains de céréales par isolement mycologique semi-sélectif et étude microbiologique. Réf. MH-03.16: version B.
- Obanor F, Chakraborty S. 2014. Aetiology and toxigenicity of *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* causing crown rot and head blight in Australia under natural and artificial infection. *Plant Pathol*. 63(6):1218–1229.
- Qostal S, Kribel S, Chliyeh M, Serghat S, Selmaoui K, Touhami AO, Zaarati H, Benkirane R, Douira A. 2019. Study of the fungal complex responsible for root rot of wheat and barley in the north-west of morocco. *Plant Arch*. 19(2):2143–2157.
- Ramchandra S, Bhatt PN. 2012. First report of *Fusarium equiseti* causing vascular wilt of cumin in India. *Plant Dis*. 96(12):1821.
- Rebib H, Bouraoui H, Rouaissi M, Brygoo Y, Boudabbous A, Hajlaoui MR, Sadfi-Zouaoui N. 2014. Genetic diversity assessed by SSR markers and chemotyping of *Fusarium culmorum* causal agent of foot and root rot of wheat collected from two different fields in Tunisia. *Eur J Plant Pathol*. 139(3):481–495.
- Rodrigues AAC, Menezes M. 2005. Identification and pathogenic characterization of endophytic *Fusarium* species from cowpea seeds. *Mycopathologia*. 159(1):79–85.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 4(4):406–425.
- Scherm B, Balmas V, Spanu F, Pani G, Delogu G, Pasquali M, Migheli Q. 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Mol Plant Pathol*. 14(4):323–341.
- Seddique S, Yusuf U, Zainudi N. 2010. Morphological and molecular detection of *Fusarium chlamydosporum* from root endophytes of *Dendrobium crumenatum*. *Afr J Biotechnol*. 9(26):4081–4090.
- Smiley RW, Yan H. 2009. Variability of *Fusarium* crown rot tolerances among cultivars of spring and winter wheat. *Plant Dis*. 93(9):954–961.
- Stępień L, Gromadzka K, Chełkowski J. 2012. Polymorphism of mycotoxin biosynthetic genes among *Fusarium equiseti* isolates from Italy and Poland. *J Appl Genet*. 53(2):227–236.
- Wu AB, Li HP, Zhao CS, Liao YC. 2005. Comparative pathogenicity of *Fusarium graminearum* isolates from China revealed by wheat coleoptile and floret inoculations. *Mycopathologia*. 160(1):75–83.
- Yezli W, Hamini-Kadar N, Zebboudj N, Blondin L, Tharreau D, Kihal M. 2019. First report of crown and root rot of tomato caused by *Fusarium equiseti* in Algeria. *J Plant Pathol*. 101(4):1249–1249.