

Influence of Syrian Local Isolate of the Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai in Inhibiting Growth of Chocolate Spot Disease on Faba Bean (*Botrytis fabae* Sard) in Vitro

Dr. Mahmoud Hasan*
Dr. Gamal Al-Ahmad*
Munzer Tamouz**

(Received 26 / 6 / 2018. Accepted 10 / 1 / 2019)

□ ABSTRACT □

The influence of two isolates of the fungus *Trichoderma harzianum* (one of them commercial and the other local) were compared in laboratory conditions against *Botrytis fabae* which causes Chocolate Spot Disease on faba bean plants (*Vicia faba*).

Results showed that the two isolates have good significant ability to inhibit the studied disease fungus directly or indirectly. The efficacy of the local isolate in the dual culture was significantly better than the commercial one, because its inhibiting ability reached 59.5% after 14 days of incubation conditions compared with 47.9% for the commercial one. On other hand, the indirect inhibiting ability, in similar conditions reached 36.8%, 34.8% gradually due to the influence of volatiles which were produced from each of the two studied isolates, without any significant differences.

Key words: Syria, Faba bean, Chocolate Spot Disease, *Botrytis fabae*, *Trichoderma harzianum*.

*Professor, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Latakia, Syria.

** Doctorate student ,work manager, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Latakia, Syria.

تأثير عزلة سورية محلية من الفطر *Trichoderma harzianum* Rifai في تثبيط نمو الفطر المسبب لمرض التبقع الشوكلاتي على الفول (*Botrytis fabae* Sard) مخبرياً

د. محمود حسن *

د. جمال الأحمد *

منذر تموز **

(تاريخ الإيداع 26 / 6 / 2018. قبل للنشر في 10 / 1 / 2019)

□ ملخص □

تمت دراسة كفاءة عزلة محلية من الفطر تريكوديرما *Trichoderma harzianum* بالمقارنة مع عزلة أخرى تجارية من النوع نفسه في تثبيط نمو عزلة محلية من الفطر *Botrytis fabae* المسبب لمرض التبقع الشوكلاتي على نبات الفول *Vicia faba* L. في سوريا ضمن ظروف المختبر في حال التضاد المباشر وفي حال التضاد غير المباشر. أظهرت النتائج مقدرة معنوية لكل من العزلتين المدروستين من الفطر تريكوديرما على تثبيط نمو الفطر الممرض المدروس في حالتي التضاد المباشر أم غير المباشر، وتوقفت العزلة المحلية بشكل معنوي على العزلة التجارية إذ بلغت كفاءتها في تثبيط نمو عزلة الفطر الممرض المدروسة في حال التضاد المباشر بعد 14 يوم من التحضين 59% مقارنة بـ 47.9% على التوالي، في حين بلغت كفاءة التثبيط في حال التضاد غير المباشر والعائد لفعل المنتجات الغازية Volatiles من مستعمرة كل من العزلة المحلية والتجارية 36.8% و 34.8% على الترتيب ودون فرق معنوي بينهما.

الكلمات المفتاحية : سوريا، الفول، مرض التبقع الشوكلاتي *Botrytis fabae*، Chocolate Spot Disease، *Trichoderma harzianum*.

* أستاذ - قسم وقاية النبات - كلية الزراعة جامعة تشرين - اللاذقية - سوريا

** طالب دكتوراه - مدير أعمال - قسم وقاية النبات - كلية الزراعة جامعة تشرين - اللاذقية - سوريا

طرائق البحث ومواده

تم تنفيذ تجارب هذا البحث في مختبرات قسم وقاية النبات بكلية الزراعة - جامعة تشرين وكررت ثلاث مرات خلال العامين 2017 و2018، وفق تصميم العشوائية الكاملة، والنتائج المعروضة هي متوسطات نتائج التجارب الثلاث. مصدر العزلة الأولى من الفطر تريكوديرما *T. harzianum* المستخدمة في هذا البحث هو الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بدمشق (عزلة تجارية)، أما العزلة الثانية من الفطر تريكوديرما فهي محلية ورمزها في المختبر *T.harzianum* (T9) تم عزلها من تربة زراعية في محافظة اللاذقية، وهاتان العزلتان محفوظتان في البراد في مختبر المبيدات - قسم الوقاية - كلية الزراعة بجامعة تشرين على درجة حرارة 4-7 °سلسيوس، ويجري تجديدهما دورياً منذ العام 2001، بينما عزلة الفطر *B. fabae* المسبب لمرض التبقع الشوكلاتي على الفول فهي محلية أيضاً وقد تم عزلها من نباتات مصابة بمرض التبقع الشوكلاتي من حقل مزروع بنبات الفول في محافظة حماة في سوريا في شهر نيسان العام 2017، وتم حفظها أيضاً في البراد.

نُفذ اختباراً تأثير التضاد المباشر والتضاد غير المباشر لكل من عزلتي الفطر تريكوديرما المدروستين مع الفطر الممرض المدروس، وخصصت ثلاثة مكررات لكل معاملة من المعاملات المدروسة في كل من الاختبارين، وحضنت معاملات الاختبارين بنفس التوقيت معاً كل مرة في ظروف الإضاءة الطبيعية في المختبر بترك الباب الخارجي للحاضنة مفتوحاً، بينما أوصد الباب الداخلي الزجاجي محكم الإغلاق ليحفظ الحرارة على درجة 22 ± 1 °سلسيوس لمدة 14 يوم.

أولاً: اختبار تأثير التضاد المباشر:

احتوى كل مكرر من معاملات هذا الاختبار 20 مل مستنبت Potato Dextrose Agar (PDA) الصلب المغذي المضاف له محلول الأميسيلين (مضاد حيوي) بتركيز 10 وحدات دولية لكل مليلتر (مل)، وزرعت قطعة دائرية بقطر 4 ملمتر من حواف مستعمرة الفطر تريكوديرما (بعمر أربعة أيام) على سطح مستنبت PDA قرب حافة الطبق، ومقابلها على سطح المستنبت نفسه في الطرف الآخر من الطبق زرعت قطعة دائرية بنفس القطر من الفطر الممرض *B. fabae* (من مستعمرة بعمر عشرة أيام)، أما مكررات معاملة الشاهد فقد زرعت فيها بالطريقة نفسها قطعة مشابهة من الفطر الممرض دون زراعة قطعة من الفطر تريكوديرما (تموز، 2005؛ Bendahmane et al., 2012)، تم قياس وتسجيل قيمة نصف قطر مستعمرة الفطر الممرض (بالملمتر) على المحور الكائن بين مركزي قطعتي الفطرين المتضادين في المكرر بعد 14 يوم. وحسبت المقدر على التثبيط بهذه الطريقة (كفاءة التثبيط المباشر%) من خلال معادلة (Abbott, 1925):

كفاءة التثبيط المباشر% = ((متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر *B. fabae* في الشاهد - متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر *B. fabae* في معاملة التضاد المباشر مع الفطر تريكوديرما) / متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر *B. fabae* في الشاهد) X 100

ثانياً: اختبار تأثير التضاد غير المباشر:

نُفذ هذا الاختبار لدراسة كفاءة كل من عزلتي الفطر تريكوديرما المدروستين من خلال معرفة تأثير أو فعالية المنتجات الطيارة Volatiles لكل من العزلتين المدروستين في نمو عزلة الفطر الممرض المدروسة في المختبر حسب (تموز، 2005؛ Bendahmane et al., 2012)، بهدف تحديد (كفاءة التثبيط غير المباشر%)، كان المكرر الواحد في كل من معاملات هذا الاختبار هو عبارة عن صحنين طبقيين بترتي، تم إحكام إطباق فوهتيهما على بعضهما البعض ضمن

غرفة العزل بشريط من البارافلم اللاصق بعد الزراعة، وقد احتوى كل منهما 20 مل فقط من مستنبت PDA (ممزوجاً بمحلول المضاد الحيوي السابق الذكر والتركيز نفسه)، زرعت قطعة دائرية من عزلة الفطر تريكوديرما المدروسة (من مستعمرة بعمر أربعة أيام) بقطر 4 سم في وسط المستنبت على الطبقة السفلي ويقابلها قطعة دائرية بالقطر نفسه من الفطر الممرض المدروس على المستنبت في الطبقة العلوي)، مكررات الشاهد في هذا الاختبار هي أطباق مزدوجة بنفس الطريقة دون زراعة الفطر تريكوديرما في الطبقة القاعدي، تم قياس وتسجيل قيمة قطر مستعمرة الفطر الممرض في كل مكرر (بالملمتر) بعد 14 يوم من التحضين ضمن نفس الشروط المذكورة أعلاه ومتوسط القيمة الناتجة لنصف قطر مستعمرة الممرض، وحسبت المقدرة على التثبيط غير المباشر % من خلال تطبيق معادلة (Abbott, 1925) السابقة الذكر.

تم استخدام البرنامج الحاسوبي GenStat Release 12.1 حسب دانكان وأقل فرق معنوي LSD عند مستوى دلالة 1% لتحليل النتائج إحصائياً في كلا الاختبارين.

النتائج والمناقشة

توضح النتائج المدونة في الجدول (1) أن قيمة متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر *B. fabae* في معاملة الشاهد بلغت 40.3 ملم بعد 14 يوم من التحضين في ظروف التجربة في المختبر لكن قيم متوسط نصف قطر الفطر الممرض كانت أقل بكثير في المعاملات الأخرى ضمن الشروط نفسها تحت تأثير التضاد المباشر مع كل من عزلة الفطر تريكوديرما التجارية والمحلية فقد بلغت 21.0 ملم و16.3 ملم على الترتيب، أي أن كفاءة العزلة المحلية من الفطر تريكوديرما في تثبيط نمو مستعمرة الفطر الممرض *B. fabae* كانت أكبر فقد بلغت 59.5% في حين أنها كانت 47.9% فقط بالنسبة للعزلة التجارية أي أن مقدرة العزلتين المدروستين من الفطر تريكوديرما كانت جيدة ومعنوية في تثبيط الفطر الممرض *B. fabae* عند التضاد المباشر ضمن ظروف التجربة وتوقفت العزلة المحلية بكفاءتها على كفاءة العزلة التجارية في تثبيط الفطر الممرض مخبرياً وبشكل معنوي في حال التضاد المباشر.

الجدول (1) تأثير التضاد المباشر لكل من عزلتَي الفطر *T. harzianum* التجارية والمحلية المدروستين مع الفطر *B. fabae* في المختبر

| متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر <i>B. fabae</i> (ملم) بعد 14 يوم تحضين | | | التجربة |
|--|--|--------|----------|
| عند التضاد مع العزلة المحلية <i>T. harzianum</i> | عند التضاد مع العزلة التجارية <i>T. harzianum</i> | الشاهد | |
| 18.0 | 26.0 | 40.0 | الأولى |
| 16.0 | 19.0 | 40.0 | الثانية |
| 15.0 | 18.0 | 41.0 | الثالثة |
| 16.3 c | 21.0 b | 40.3 a | المتوسط |
| 1.741 | | | LSD 0.01 |

ويبين من النتائج الموضحة في الجدول (2) أن عزلتَي الفطر تريكوديرما المدروستين بطريقة التضاد غير المباشر قد أثرتا بشكل ملحوظ من خلال النواتج الطيارة Volatiles لكل منهما في تثبيط نمو مستعمرة الفطر الممرض المدروس في التجارب الثلاث، وبشكل معنوي واضح، حيث وصلت قيمة نصف قطر مستعمرة الممرض (كمتوسط لثلاث

تجارب) بعد 14 يوم من التحضين 33.5 ملم، في حين أن المواد الطيارة المنتجة من كل من عزلت الفطر تريكوثيرما التجارية والمحلية قد استطاعت تثبيط نمو مستعمرة الفطر الممرض بشكل معنوي إلى 21.8 و 21.2 ملم على التوالي ودون فرق معنوي بين تأثيريهما.

إن التأثير الإيجابي لفعالية كل من العزلة المحلية والعزلة التجارية المدروستين من الفطر تريكوثيرما، من خلال مقدرتهما على التثبيط غير المباشر لنمو مستعمرة الفطر الممرض المدروس، والذي بلغ 36.8% و 34.8% في ظروف اختبار التضاد غير المباشر هو مقدره إيجابية جيدة رغم أنها محفوظة في ظروف المختبر ويتم تجديدهما منذ 17 عاماً، حيث أن متوسط كفاءة كل من هاتين العزلتين المحلية والتجارية في المختبر في ذلك الوقت بلغت في حال التضاد المباشر مع ست من عزلات الفطر فيوزاريوم *Fusarium sp.* مسببة لمرض الذبول الفيوزاريومي على البندورة 43.8% و 47.9% على التوالي، وكانت كفاءتهما في التثبيط في حال التضاد غير المباشر مع عزلات الفيوزاريوم المذكورة نفسها 29.3% و 27.9% على الترتيب (تموز، 2005).

تجدر الإشارة إلى أن مدة التجربة في كل من الطريقتين المباشرة وغير المباشرة للتضاد في هذا البحث تم إيقافها بعد أسبوعين فقط من بدء التجربة وتقييم النتائج بسبب بدء وصول نموات الخيوط الفطرية للفطر تريكوثيرما في المكررات إلى المستنبت في الطبق العلوي (الذي زرع عليه الفطر الممرض بطريقة التضاد غير المباشر) مما تعذر معه المتابعة في دراسة هذا النوع من التأثير لمدة أطول، كما ويجدر التنويه إلى أن اختلاف قيمة متوسط قطر مستعمرة الفطر الممرض في الشاهد بين الاختبارين عائد لاختلاف طريقة تحضير مكررات الشاهد في اختبار التضاد المباشر عن الشاهد في طريقة التضاد غير المباشر، حيث أن قطعة الفطر الممرض وُضعت على طرف المستنبت في مكررات الشاهد للاختبار الأول فتوجهت النموات كلها باتجاه واحد بينما وضعت قطعة الفطر الممرض وسط المستنبت في الطبق العلوي لدى دراسة التضاد غير المباشر (في حالة الاختبار الثاني) مما سمح لها بالنمو بشكل متجانس بكل الاتجاهات على المستنبت كما حصلت على حيز من الهواء بلغ ضعف المتاح لمستعمرة الممرض في مكررات الشاهد لاختبار التضاد المباشر.

الجدول (2) تأثير التضاد غير المباشر لكل من عزلت الفطر *T. harzianum* التجارية والمحلية مع الفطر *B. fabae* في المختبر

| متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر <i>B. fabae</i> (ملم) بعد 14 يوم تحضين | | | التجربة |
|--|--|--------|----------|
| عند التضاد غير المباشر مع <i>T. harzianum</i> المحلية | عند التضاد غير المباشر مع <i>T. harzianum</i> التجارية | الشاهد | |
| 21.5 | 22.0 | 32.5 | الأولى |
| 21.0 | 22.5 | 33.5 | الثانية |
| 21.0 | 21.0 | 34.5 | الثالثة |
| 21.2 b | 21.8 b | 33.5 a | المتوسط |
| 2.26 | | | LSD 0.01 |

كانت قيم نصف قطر المستعمرة متقاربة جداً وكثيراً ما كانت متطابقة في المعاملة الواحدة، لكنها تباينت قليلاً فيما بين التجارب الثلاث لكل طريقة وهذا أمر طبيعي، لكن لا يمكن الاستنتاج من تقارب القيم المطلقة لقيم متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر الممرض المدروس المبينة في الجدولين (1) و (2) أن تأثير التضاد غير المباشر مقارب أو أكبر من فعل التضاد المباشر، لأن تأثير فعل التضاد غير المباشر بالمنطق هو موجود ضمن محصلة التأثير في حال اختبار

التضاد المباشر، لكن في الواقع قامت نموات مستعمرة كل من عزلتي الفطر تريكوديرما في حالة التضاد المباشر بإيقاف نمو مستعمرة الفطر الممرض خلال 3-4 أيام فقط من بداية الاختبار (بينما استمرت المستعمرة بالنمو في مكررات معاملة الشاهد) وبما أنهما على مستنبت واحد ضمن الطبق نفسه فإن كلاً من مستعمرة العزلة المحلية والعزلة التجارية للتريكوديرما قد منعت مستعمرة الفطر الممرض من الاستمرار بالنمو، بل بدأت نموات الخيوط الفطرية للفطر تريكوديرما لكل من العزلتين التجارية والمحلية بالنمو على مستعمرة الفطر الممرض وبدأت بالتطفل عليها، وهذه آلية تأثير معروفة ومثبتة سابقاً (DENIS and Webster, 1971 c)، في حين أن مستعمرة الفطر الممرض في حال التضاد غير المباشر استمرت بالنمو على المستنبت وبقي العامل الوحيد المؤثر المثبط لنموها مقارنة بالشاهد هو المواد الطيارة التي أنتجها الفطر تريكوديرما وبتراكمها مع الوقت في الحيز الكائن بين طبقي البتري المطبقين على بعضهما البعض اتضح دور هذه المنتجات الغازية في تثبيط نمو مستعمرة الفطر الممرض بشكل غير مباشر حتى أن سماكة نموات مستعمرة الفطر الممرض في المعاملات كانت أقل من نصف سماكتها في مكررات الشاهد على الأقل.

توافقت نتائج هذه التجربة مع نتائج دراسات أخرى لجهة إثبات المقدرة الإيجابية الجيدة لأنواع الجنس الفطري تريكوديرما في تثبيط الفطور الممرضة كاستخدامه ضد الفطر الممرض *Botrytis cineria* (حمودي، 2014)، ومع نتائج دراسات أخرى نجحت فيها أنواع الفطر تريكوديرما *T. harzianum*، *T. viride*، و *T. longibrachiatum* في تثبيط الفطر *B. fabae* المسبب لمرض التبقع الشوكلاتي على الفول بكفاءة تراوحت بين 27.4 - 70.1% (Bendahmane, 2012)، وتوافقت أيضاً مع نتائج Mbazia (2016 b) الذي استخدم كلاً من النوعين *Trichoderma viride* و *T. harzianum* وحصل على كفاءة تثبيط في حال التضاد المباشر مع الفطر الممرض المدروس نفسه (*B. fabae*) وكفاءة بلغت 65.0% و 58.3% على التوالي. تُعزى كفاءة أنواع الفطر تريكوديرما في تثبيط نمو الفطريات الممرضة في المختبر *in vitro* وتتباين الفعالية حسب نواتج الاستقلاب التي يفرزها في وسط النمو وكمياتها وهي مواد طيارة *volatiles* وأخرى غير طيارة *non-volatiles* إضافة إلى أهمية دور المقدرة التطفلية لخيوطه الفطرية على مكونات مستعمرات الفطريات التي تعيش معه في الوسط نفسه (DENIS and Webster, 1971 a, b, and c) وهذه الآليات هي التي تفسر كفاءة فعل وتأثير العزلتين المدروستين في هذا البحث والتي اتضحت من خلال دراسة التضاد المباشر والتضاد غير المباشر مع الفطر الممرض المدروس.

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات

- 1- أثبتت كل من عزلتي الفطر *Trichoderma harzianum* التجارية والمحلية المدروستين مقدرة جيدة على التضاد مع الفطر *Botrytis fabae* وتثبيط نموه في ظروف المختبر.
- 2- تفوقت العزلة المحلية من الفطر *Trichoderma harzianum* بشكل معنوي على العزلة التجارية من النوع نفسه في تثبيط نمو الفطر *Botrytis fabae* في حال التضاد المباشر ضمن الشروط المخبرية المدروسة.
- 3- تفوقت العزلة المحلية من الفطر *Trichoderma harzianum* على العزلة التجارية من النوع نفسه في تثبيط نمو الفطر *Botrytis fabae* وبفرق غير معنوي في حال التضاد غير المباشر ضمن الشروط المخبرية المدروسة.

التوصيات:

متابعة العمل على عزلتي الفطر *Trichoderma harzianum* المدروستين واختبار كفاءة كل منهما في الظروف الحقلية لمعرفة مقدرة كل منهما على تثبيط مرض التبقع الشوكلاتي على الفول المتسبب عن الفطر *Botrytis fabae* بالطرائق المناسبة وقائياً وعلاجياً كبداية لمستحضرات المبيدات الفطرية الكيميائية.

المراجع:

- 1- تموز، منذر. *المكافحة الحيوية لبعض فطريات التربة الممرضة لنبات البندورة (Fusarium sp. وythium sp.)*. رسالة ماجستير - قسم وقاية النبات - كلية الزراعة - جامعة تشرين. 2005. 112 صفحة.
- 2- حمودي، عمر. *تأثير بعض عوامل المكافحة الأحيائية في مكافحة التعفن الرمادي Botrytis cinerea على البندورة/الطماطم والفريز/الفراولة تحت ظروف المختبر والدفينة*. مجلة وقاية النبات العربية، مجلد 32، العدد 1. 14 الصفحات 64-71.
- 3- ABBOTT, W. S. *A method for computing the effectiveness of an insecticide*. J. Econ. Entomol. Vol. 18, 1925, 265-267.
- 4- BENDAHMANE, B., Mahiout, D., Benzohra, I., and Benkada, M. *Antagonism of Three Trichoderma Species Against Botrytis fabae and B. cinerea, the Causal Agents of Chocolate Spot of Faba Bean (Vicia faba L.) In Algeria*. World Appl. Sci. J., Vol. 17, N°. 3, 2012, 278-283.
- 5- BERNIER, C., Hanounik, S., Hussein, M., and Mohamed, H. *Field Manual of comon faba diseases in the nile valley*. Information Bulletin No. 3, ICARDA (International Center for Agricultural Research in Dry Areas). 1984, 40 p.
- 6- DERBALAH, A., El-Kot, G., Hafez, Y., and Omar, A. *Non-traditional Methods to Control Choclate Spot of Faba bean Caused by Botrytis fabae Sard under Greenhouse Conditions*. Egyptian journal of pest control, Vol. 23, 2013, 137-144.
- 7- DENIS, C. and Webster, J. *Antagonistic properties of species groups of Trichoderma. I. Production of non-volatile antibiotics*. Transactions of the British Mycological Society, Vol. 57, 1971 a, 25-39.
- 8- DENNIS, C. and Webster, J. *Antagonistic properties of species group of Trichoderma. II. Production of volatile antibiotics*. Transactions of the British Mycological Society, Vol. 57, 1971 b, 41-48.
- 9- DENNIS, C. and Webster, J. *Antagonistic properties of species groups of Trichoderma III. Hyphal interaction*. Transactions of the British Mycological Society, Vol. 57, 1971 c, 363-369.

10-EL-KOMY, M. *Comparative Analysis of Defense Responses in Chocolate Spot-Resistant and -Susceptible Faba Bean (Vicia faba) Cultivars Following Infection by the Necrotrophic Fungus Botrytis fabae*. The plant pathology journal. Vol. 30, N°. 4, 2014, 355-366.

11-EL-SAYED, S., El-Shennawy, R., and Ismail, A. I. *Fungicidal management of chocolate spot of faba bean and assessment of yield losses due to the disease*. Annals of Agricultural Sciences. Vol. 56, N°. 1, 2011, 27-35.

12-ELWAKIL, M., Abass, M., El-Metwally, M., and Mohamed, M. *Green Chemistry for Inducing Resistance Against Chocolate Spot Disease of Faba Bean*. 2016. Journal of Environmental Science and Technology. Vol. 9, N°. 1, 2016, 170-187.

13-HAILE, M., Adujna, G.; and Lemessa F. *Reactions of improved faba bean varieties to chocolate spot (Botrytis fabae Sard.) epidemics across contrasting altitudes in southwest Ethiopia*. African Journal of Agricultural Research. Vol. 11, N°. 10, 2016, 837-848.

14-MBAZIA, A., Omri Ben Youssef, N., and Kharrat, M. *Effect of some chemical inducers on chocolate spot disease of faba bean in Tunisia*. Crop Prot. Vol. 5, N°. 4, 2016 a, 541-552.

15-MBAZIA, A., Omri Ben Youssef, N., and Kharrat, M. *Tunisian isolates of Trichoderma spp. and Bacillus subtilis can control Botrytis fabae on faba bean*. 2016 b. Biocontrol Science and Technology. Vol. 26, N°. 7, 2016, 915-927.

16-PEARSON, R., Rosenberger, D., Smith, C. *Benomyl-Resistant Strains of Botrytis cinerea on Apples, Beans, and Grapes*. Plant Disease. Vol. 64, N°. 3, 1980, 316-318.

17-SILLERO, J. C., Villegas-Fernández, A. M., Thomas, J., Rojas- Molina, M. M., Emeran, A. A., Fernández-Aparicio, M. and Rubiales, D. *Faba bean breeding for disease resistance*. Field Crops Res. Vol. 115, 2010, 297-307.

18-TAFFA, E., Gurmessa, C., and Mariam, S. *In vivo Assay for Antagonistic Potential of Fungal Isolates against Faba bean (Vicia faba L.) Chocolate Spot (Botrytis fabae Sard.)*. Jordan Journal of Biological Sciences. Vol. 6, N°. 3, 2013, 183-189.

19-TEREFE, H., Fininsa, C., Sahile, S., Tesfaye, K., Dejene, M., and Tesfayle, K. *Effect of integrated cultural practices on the epidemics of chocolate spot (Botrytis fabae) of faba bean (Vicia faba) in Hararghe Highlands, Ethiopia*. Global Journal of Pests. Diseases and Crop Protection, Vol. 3, N°. 4, 2015, 113-123.