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

تقييم التداخل بين بعض أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و مبيد Topsin M في مكافحة مرض تعفن جذور الباميا

رسالة مقدَمة إلى
مجلس كلية الزراعة/ جامعة- كربلاء
و هي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير
علوم زراعية/ وقاية النبات
من قبل

أحمد ماجد محمود أمين
بأشراف
أ.م.د عقيل نزال العابدي

1443هـ 2021 م

بسم الله الرحمن الرحيم

{ وَ مَنْ يَتَقِ اللهَ يَجْعَل لَهُ مَخْرَجاً ۝ و يَرزُقَهُ مِنْ حَيثُ لا يَحتَسِبُ وَ مَن يَتوَكَل عَلى اللهِ فَهُوَ حَسبُهُ إنَ اللهَ بَلٰغُ أمرهِ قَدْ جَعَلَ اللهُ لِكُلِ شَيءٍ قَدْرا }

صدق الله العلي العظيم

سورة الطلاق: الاية (2 و3)

ألاهداء

إلى نبي الرحمه ... و خاتمهم النبي محمد (صلى الله عليه واله وسلم)

إلى الائمة المعصومين ... موضع الرسالة و خزان العلم و سلالة النبيين خاصة امامنا الغائب الحجة بن الحسن (عليهم السلام)

إلى من ربوني صغيرا ..... يا من سهروا حتى اختم مسيرتي الدراسية (أمي و أبي)

إلى نقية القلب صافية السريرة ... التي اخذت بيدي و وثقت بقدراتي داعمة جازمة إني استطيع النجاح (خالتي أم زهراء)

إلى رفيقة الكفاح ... السند الذي اعتمدت عليه فدعمتني و الرفيق العظيم الذي استأنست اليه فاعانني (زوجتي أم سما)

إلى من لم تبخل بمساعدتي يوماً .... من أمدتني بالنصح والارشاد ودعت لي بالخير(أختي أم زيد)

إلى قرة عيني ..... يا روحي و قلبي النابض يا من اتشوق لارى مستقبلها المشرق ابنتي الغاليتين (سما و ميسم)

شكر وتقدير

الشكر و الثناء لله عز وجل اولا على نعمة الصبر و القدرة على انجاز العمل.

و أتقدم بالشكر إلى استاذي الفاضل الدكتور عقيل نزال العابدي لكل ما قدمه لي من دعم و توجيه و ارشاد لاتمام هذا العمل على ما هو عليه فله اسمى عبارات الثناء و التقدير.

الشكر و التقدير إلى السادة اعضاء لجنة المناقشة المحترمين لتفضلهم بقبول قراءة الرسالة و مناقشة محتوياتها و إبداء ملاحظاتهم السديدة عليها.

كما و أتقدم بوافر الشكر و الثناء إلى اساتذتي في كلية الزراعة – جامعة كربلاء و المتمثل بالسيد العميد الدكتور ثامر الجنابي و رئيس القسم الدكتور ياسر ناصر حسين و الدكتورة زينب عليوي التميمي والدكتور حميد خشان الفرطوسي و الدكتور جاسم وهاب محمد و دكتورة رواء غافل و دكتورة فرح، كلية التربية العلوم الصرفة.

و اشكر زملائي و زميلاتي طلبة الدراسات العليا لما ابدوه من مساعدة و تعاون في اتمام الرسالة.

الخلاصة:

هدفت هذه الدراسة إلى عزل و تشخيص مسبب مرض تعفن البذور و موت البادرات من جذور الباميا [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench] المصابة و مكافحته باستخدام المبيد الكيميائي Topsin M و بعض أنواع الفطر (*T. atroviride* و *T. longibrachaitum* و *T. asperellum* و *T. aspirelloides*) و إيجاد صيغة تكاملية فيما بينها في مقاومة المسبب المرضي. كما هدفت الدراسة الحالية إلى امكانية تصنيع مستحضر حيوي من الفطر *Trichoderma* spp. نفذت جميع تجارب هذه الدراسة في/ مختبرات و حقول/ قسم وقاية النبات/ كلية الزراعة/ جامعة كربلاء خلال الموسم الزراعي 2020 - 2021.

تم الحصول على 15 عزلة فطرية شخصت مظهرياً على انها أنواع مختلفة تابعة للفطر *Fusarium* spp. اثبتت نتائج اختبار القدرة الامراضية (Pathogenicity test) لهذه العزلات الفطرية في الاصص البلاستيكية ان جميع العزلات كانت ممرضة و بنسب إنبات البذور تراوحت بين 0.00% - 73.30% و بفارق معنوي عن نسبة الانبات في معاملة المقارنة التي بلغت 100%. عزلة الفطر (5) كانت الأشد امراضية مقارنة بالعزلات الاخرى من خلال منع انبات بذور الباميا (0.00%) مقارنة بالعزلة (1) التي كان لها تأثير قليل في خفض النسبة المئوية لإنبات البذور (72.60). شخصت عزلة الفطر الأشد امراضية (عزلة 5) على انها *Fusarium culmorum* من خلال الاعتماد على الصفات المظهرية و كذلك الجزيئية باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain rection, PCR) و تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية.

أثبتت النتائج ان جميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp. كان لها تأثير معنوي في تثبيط عزلات الفطر الممرض *F. culmorum* قياساً بمعاملة المقارنة (الفطر الممرض بمفرده). كما أظهرت نوعي الفطر (1) *T. harzianum* و (5) *T. aspirelloides* كفاءة عالية في تثبيط نمو الفطر الممرض (88.00% و 87.66%، على التوالي)، في حين وجد ان اقل نسبة تثبيط للفطر الممرض (66.66%) كانت لنوع الفطر (3) *T. longibrachaitum*.

و أظهرت النتائج أن هناك قدرة تضادية بين الفطر *T. harzianum* و الفطر *T. longibrachaitum* و الفطر *T. asperellum* في حين لم يظهر الفطر *T. harzianum* قدرة تضادية ضد الأنواع *T. atroviride* و *T. aspirelloides*. لوحظ ان اعلى قدرة تثبيطية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *F. culmorum* عند تواجد جميع الأنواع الفطر المقاوم معاً في نفس طبق بتري، اذ بلغت نسبة التثبيط للفطر الممرض 95%. برهنت النتائج أيضاً ان لتراكيز (20 و 40 و 60 و 80%) رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. تأثيراً واضحاً في زيادة نسب انبات بذور

نباتات الباميا و الذرة الصفراء و الفجل و كان التركيز 100% الأكثر تشجيعا لإنبات البذور و زيادة للوزن الجاف للنباتات المذكورة اعلاه.

كما بينت النتائج ان لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. تأثيراً في تثبيط انتاج النبات لحامض الابسيسك (Abscisic acid) و بمعدل وصل إلى 13.22 ملغم. لتر$^{-1}$ و الذي اختلف بشكل معنوي عن محتواه في النباتات النامية في معاملة المقارنة و التي بلغ معدلها 22.60 ملغم. لتر$^{-1}$. كما أثبتت النتائج ان لوجود أنواع الفطر *Trichoderma* spp. دوراً واضحاً في زيادة محتوى النبات من هرمون الجبرلين (GA_3) و الذي كان أعلى مستوى له (85.09 ملغم. لتر$^{-1}$) في النباتات النامية في تربة ملوثة بجميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp. قياساً بمحتواه في نباتات المقارنة (غير ملوثة بأي فطر) و الذي بلغ 43.33 ملغم. لتر$^{-1}$. كما وجد ان لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في هذه الدراسة قدرة على النمو في معظم تراكيز المبيد الكيميائي Topsin M (0.25 و 0.50 و 0.75 و 1.00 و 1.25 مل/ لتر) و كان التركيز 0.25 مل/ لتر الاقل تثبيطاً لجميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp.، في حين بلغ تثبيط نمو الفطر *F. culmorum* تحت تأثير نفس التركيز 82.35%. اثبتت النتائج أيضاً انه بالإمكان استخدام الفطر الحيوي *Trichoderma* spp. بشكل مفرد او متداخل مع المبيد الكيميائي Topsin M في مقاومة الفطر الممرض *F. culmorum* بدون حدوث اي تأثير على أنواع الفطر *Trichoderma* spp. تبين ايضاً ان لاستخدام المبيد الكيميائي و أنواع الفطر *Trichoderma* spp. تأثيراً معنوياً في زيادة انبات بذور نبات الباميا و الوزن الجاف لبادراتها قياساً بمعاملة المقارنة. بينت النتائج أيضاً ان أفضل عدد للوحدات التكاثرية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. تحقق عند تنميتها على وسط الخباز المطحون و المعقم و المضاف اليه الحديد بتركيز 0.75 غم مادة تجارية/ لتر و المحمل على مادة التالك و المخزون في اكياس ورقية، فقد أعطت هذه المعاملة كفاءة خزن لأنواع الفطر حتى بعد مرور 180 يوماً من الخزن في درجة حرارة 4 مْ و الخزن في ظروف المختبر و بعدد وحدات تكاثرية بلغت 105.96 و 96.77 وحدة تكاثرية/ مل، على التوالي. كما وجد ان تنمية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على الخباز المطحون و المعقم و تخزينه بدون اي مادة حاملة كان الافضل في المحافظة على حيوية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. مقارنة بتحميله على المواد الحاملة الاخرى (349.33 وحدة تكاثرية/ مل) مما يشجع استخدام نبات الخباز المطحون و المعقم في تنمية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. للاستخدام المباشر أو التخزين بعد التحضير.

المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
1	**المقدمة**	1
2	**مراجعة المصادر**	3
1-2	أهمية محصول الباميا	3
2-2	أهمية الافات التي تصيب محصول الباميا	4
3-2	الأهمية الاقتصادية لمرض تعفن البذور وموت البادرات	4
4-2	الفطر *Fusarium culmorum*	5
5-2	تشخيص الفطريات	7
1-5-2	التشخيص المظهري للفطريات	7
2-5-2	التشخيص الجزيئي للفطريات	8
6-2	مكافحة الفطريات المسببة لأمراض النبات	9
1-6-2	المقاومة الكيميائية	9
2-6-2	استخدام الفطر *Trichoderma* spp. في المقاومة الاحيائية	10
1-2-6-2	آلية عمل الفطر *Trichoderma* spp.	11
7-2	الاوساط التخمرية و المواد لحاملة المستعملة في تنمية و اكثار فطريات المقاومة الاحيائية	15
8-2	الانزيمات النباتية	16
9-2	الهرمونات النباتية	17
3	**المواد وطرائق العمل**	19
1-3	الأجهزة و الأدوات و المواد المستخدمة في الدراسة	19
1-1-3	الأجهزة و الأدوات المستخدمة في الدراسة	19
2-1-3	المواد المستعملة لاجراء التجارب في هذه الدراسة الاوساط الزرعية و المواد الكيميائية المستخدمة في هذه الدراسة	21
3-1-3	الاوساط الزرعية المستخدمة في هذه الدراسة	22
1-3-1-3	وسط البطاطا دكستروز الجاهز (P.D.A)	22
2-3-1-3	وسط الاكار المائي Water Agar (W.A)	22
3-3-1-3	وسط البطاطا سكروز السائل P.S.B (Potato Sucrose Broth)	22
2-3	مصدر الفطريات الممرضة و أنواع فطريات المقاومة المستعملة في هذه الدراسة *Trichoderma* spp.	22
1-2-3	مصدر الفطريات الممرضة المعزولة في هذه الدراسة	22
2-2-3	أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستعملة في الدراسة	23
3-3	حفظ العزلات الفطرية قيد الدراسة	23
1-3-3	الحفظ في أنابيب اختبار حاوية على الوسط الزرعي (PDA) المائل (Agar slants)	23
2-3-3	الحفظ بواسطة الكليسرول (Glycerol 60 %)	24
4-3	تحميل الفطريات المعزولة على بذور الدخن	24
5-3	اختبار القدرة الامراضية للفطريات المعزولة	24
1-5-3	اختبار القدرة الامراضية للفطريات المعزولة ضد انبات بذور الباميا على وسط الاكار المائي (Water Agar)	24
2-5-3	اختبار القدرة الامراضية للعزلات الفطرية ضد انبات بذور الباميا في	25

	الاصص البلاستيكية	
6-3	تشخيص العزلة الاكثر ضراوة المعزولة في هذه الدراسة	25
1-6-3	التشخيص المظهري للعزلة الاكثر ضراوة المعزولة في هذه الدراسة	25
2-6-3	التشخيص الجزيئي للفطر الاكثر ضراوة المعزول في هذه الدراسة	26
1-2-6-3	استخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين (DNA) من عزلة الفطر *Fusarium* sp. (5) المعزولة في هذه الدراسة	26
2-2-6-3	تقدير تركيز و نقاوة مستخلص الحامض النووي (DNA)	27
3-2-6-3	استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)	27
4-2-6-3	الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز	28
5-2-6-3	تحليل تسلسل قواعد النيتروجينية للحامض النووي (DNA) المضاعف من العزلة الفطرية	29
7-3	اختبار القدرة التضادية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *F. culmorum* في الوسط الزرعي PDA	29
8-3	اختبار القدرة التكاملية بين أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في مقاومة الفطر الممرض *F. culmorum* في الوسط الزرعي P D A	30
9-3	اختبار القدرة التضادية بين أكثر من نوع من أنواع الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *F. culmorum* في الوسط الزراعي (P.D.A)	30
10-3	تأثير رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على نسبة إنبات بذور بعض النباتات و الوزن الجاف لبادراتها في أطباق بتري	30
1-10-3	تحضير رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp.	30
2-10-3	تأثير تراكيز مختلفة من رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على نسبة إنبات بذور بعض النباتات و الوزن الجاف لبادراتها في أطباق بتري	31
11-3	تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و الفطر الممرض *F. clumorum* على محتوى نبات الباميا من انزيمات البيروكسيديز (Peroxidase) و الكاتاليز (Catalase)	32
1-11-3	تهيئة نباتات الباميا المعاملة بالفطر الممرض *F. clumorum* و أنواع الفطر *Trichoderma* spp.	32
2-11-3	تقديرفعالية انزيم البيروكسيديز (Peroxidase) و الكاتاليز (Catalase) في نباتات الباميا المعاملة بالفطر الممرض *F. culmorum* و أنواع الفطر *Trichoderma* spp.	32
1-2-11-3	تقدير فعالية انزيم البيروكسيديز (Peroxidase) في نباتات الباميا المعاملة بالفطرالممرض *F. clumorum* و أنواع الفطر *Trichoderma* spp.	32
2-2-11-3	تقدير فعالية انزيم الكاتاليز Catalase (CAT)	34
12-3	تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في هذه الدراسة على محتوى النبات من بعض الهرمونات النباتية	35
1-12-3	تهيئة نباتات الباميا المعاملة بالفطر الممرض *F. clumorum* و أنواع الفطر *Trichoderma* spp.	35
2-12-3	تقدير الهرمونات	35
13-3	تأثير تراكيز مختلفة من المنغنيز المخلبي (MnEDTA) و الحديد المخلبي (FeEDTA) على نمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp.	36
14-3	تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على محتوى نبات الباميا من العناصر المعدنية البوتاسيوم و النتروجين والفسفور	36

1-14-3	هضم العينات النباتية	36
2-14-3	تحليل البوتاسيوم	37
3-14-3	تحليل النتروجين	37
4-14-3	تحليل الفسفور	37
15-3	تأثير تراكيز مختلفة من المبيد الكيميائي Topsin M في نمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و الفطر الممرض *F. culmorum* في أطباق بتري	38
16-3	تأثير المبيد الكيميائي Topsin M و أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في إنبات بذور و نمو بادرات الباميا و الوزن الجاف لها في الاصص البلاستيكية	38
17-3	تصنيع مبيد حيوي من أنواع الفطر *Trichoderma* spp.	39
1-17-3	تحديد الوسط الملائم لنمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp.	39
2-17-3	تحضير لقاح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و اختيار مادة التحميل المناسبة	40
3-17-3	تحميل لقاح الفطر *Trichoderma* spp. على بعض المواد الحاملة	40
18-3	تصميم التجارب و تحليلها احصائياً	41
4	**النتائج و المناقشة**	42
1-4	العزل و التشخيص المظهري للفطريات الممرضة	42
2-4	اختبار القدرة الامراضية (Pathogencity test)	44
1-2-4	اختبار القدرة الامراضية للفطريات المعزولة ضد انبات بذور الباميا على وسط الاكار المائي (Water Agar)	44
2-2-4	اختبار القدرة الامراضية للعزلات الفطرية في إنبات بذور الباميا في الأصص البلاستيكية	45
3-4	التشخيص المظهري الفطر لعزلة *Fusarium* spp. (5) الأكثر امراضية لبذور و بادرات الباميا	46
4-4	التشخيص الجزيئي لعزلة الفطر *Fusarium* spp. (5) الاكثر امراضية	48
5-4	اختبار القدرة التضادية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *F. culmorum* في الوسط الزرعي PDA	51
6-4	اختبار القدرة التكاملية بين أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في الدراسة	52
7-4	اختبار القدرة التضادية لأكثر من نوع للفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *F. culmorum* في الوسط الزرعي (PDA)	53
8-4	تأثير تراكيز مختلفة من رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على انبات بعض الأنواع النباتية (الباميا و الذرة و الفجل) و الوزن الجاف لبادراتها في أطباق بتري	55
9-4	تأثير تراكيز مختلفة من عنصري المنغنيز المخلبي (MnEDTA) و الحديد المخلبي (FeEDTA) على نمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في اطباق بتري	59
10-4	تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على محتوى النبات من العناصر المعدنية النتروجين و البوتاسيوم و الفسفور	62
1-10-4	عنصر النتروجين	62
2-10-4	عنصر البوتاسيوم	63
3-10-4	الفسفور	64
11-4	تأثير أنواع الفطر *Trichodrma* spp. و الفطر الممرض *F.culmorum*	66

	على محتوى نبات الباميا من الانزيمات البيروكسيديز (Peroxidase) و الكاتاليز(Catalase)	
1-11-4	انزيم البيروكسيديز(Peroxidase)	66
2-11-4	انزيم الكاتاليز(Catalase)	67
12-4	تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في هذه الدراسة على محتوى النبات من بعض الهرمونات النباتية	69
1-12-4	حامض الأبسيسك (Abscisic acid)	69
2-12-4	حامض الجبرلين (Gibberellic acid)	70
13-4	تأثير تراكيز مختلفة من المبيد الكيميائي Topsin M في نمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و الفطر الممرض *F. culmorum* في الوسط الزرعي PDA	71
14-4	تأثيرالمبيد الكيميائي Topsin M و أنواع الفطر.*Trichoderma* spp في إنبات بذور و نمو بادرات الباميا و الوزن الجاف لها في الاصص البلاستيكية	74
15-4	تصنيع المبيد الحيوي	77
1-15-4	تحديد الوسط التخمري الملائم لنمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp.	77
2-15-4	تقييم المبيد الحيوي المصنع تحت الخزن في درجة حرارة 4 مْ	79
3-15-4	تقييم المبيد الحيوي المصنع تحت الخزن في ظروف المختبر	83
5	**الاستنتاجات و التوصيات**	87
1-5	الاستنتاجات	87
2-5	التوصيات	87
6	**المصادر**	89
1-6	المصادر العربية	89
2-6	المصادر الاجنبية	91

قائمة الجداول

الرقم	العنوان	الصفحة
1	الأجهزة و الأدوات المستخدمة في الدراسة.	19
2	الأوساط الزرعية و المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة.	21
3	القدرة الامراضية للفطريات المعزولة في هذه الدراسة ضد انبات بذور الباميا على وسط الاكار المائي (Water Agar).	44
4	اختبار القدرة الامراضية للفطريات المعزولة (15 عزلة) في هذه الدراسة ضد انبات بذور الباميا في الأصص البلاستيكية.	45
5	تأثير اضافة المنغنيز(MnEDTA) و الحديد (FeEDHA) على نمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (سم) في وسط البطاطا دكستروز اكر (PDA).	61
6	تأثير أنواع الفطر *Trichodrma* spp. و الفطر الممرض *F. culmorum* على محتوى نبات الباميا من الانزيمات البيروكسيديز (Peroxidase) و الكاتاليز (Catalase).	69
7	تأثير تراكيز مختلفة من المبيد الكيميائي Topsen Mعلى نمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و الفطر الممرض *F. culmorum* في اطباق بتري.	73
8	تأثير المبيد الكيميائي Topsin M و أنواع الفطر *Tricoderma* spp. و	76

	التداخل بينهما في إنبات بذور و نمو بادرات الباميا و الوزن الجاف لها في الاصص البلاستيكية.	
9	عدد الوحدات التكاثرية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) المتكونة على أوساط التنمية (خباز و الازولا و كوالح الذرة و سعف النخيل و الثيل و التبن).	79
10	عدد الوحدات التكاثرية (وحدة تكاثرية/ مل) لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. في المستحضر المخزون في درجة حرارة 4 مْ.	82
11	عدد الوحدات التكاثرية (وحدة تكاثرية/ مل) لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. في المستحضرالمخزون في ظروف المختبر.	86

قائمة الاشكال

الرقم	العنوان	الصفحة
	مراجعة المصادر	
1	بعض الصفات المظهرية للفطر *F. culmorum*.	6
2	مناطق الـ ITS المتواجدة على الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين (rDNA) المستخدمة في تشخيص الفطريات.	9
	النتائج و المناقشة	
3	بعض الصفات المظهرية لبعض عزلات الفطر *Fusarium* spp. على وسط البطاطا دكستروز اكر (PDA) .	44
4	القدرة الامراضية للفطريات المعزولة ضد انبات بذور الباميا في أطباق بتري و الأصص البلاستيكية.	46
5	عزلة الفطر (5) الاكثر امراضية و المعزولة في هذه الدراسة.	47
6	ناتج الحامض النووي (DNA) المضاعف بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من عزلة الفطر Fusarium spp. (5) المعزولة في هذه الدراسة.	48
7	التشابه و الاختلاف في تسلسلات القواعد النيتروجينية (Sequence alignments) لنواتج الحامض النووي(PCR-amplified products) المضاعفة من عزلة الفطر *F. culmorum* المعزولة في هذه الدراسة و العزلات الأخرى العائدة لنفس الفطر و المسجلة سابقا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).	49
8	شجرة التحليل الوراثي (Neighbor-Joining tree) تبين العلاقة الوراثية لعزلات الفطر *F. culmorum* المعزولة في هذه الدراسة المسجلة سابقا في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).	49
9	القدرة التضادية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *F. clumorum* على الوسط الزرعي PDA.	50
10	القدرة التضادية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *F. clumorum* على الوسط الزرعي (PDA).	52
11	القدرة التازرية بين أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على الوسط الزرعي (PDA).	53
12	تأثير الفعل المشترك لأكثر من نوع من أنواع الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض ***F. culmorum*.**	54
13	القدرة التضادية للتداخل بين أكثر من نوع من أنواع الفطر . *Trichoderma*	54

	spp (2 و 3 و 4 و 5) ضد الفطر الممرض *F. culomrum* في طبق بتري.	
14	تأثير تراكيز مختلفة (20% و 100%) من رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على انبات بذور الباميا و الذرة و الفجل.	57
15	تأثير تراكيز مختلفة من رواشح الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في هذه الدراسة على نسبة انبات بذور الباميا و الذرة الصفراء و الفجل.	58
16	تأثير تراكيز مختلفة من رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على الوزن الجاف (غم/ بادرة) لنبات الباميا و الذرة و الفجل.	58
17	تأثير اضافة المنغنيز(MnEDTA) و الحديد (FeEDHA) إلى الوسط الزرعي (PDA) بتركيز 0.75 غم مادة تجارية/ لتر على نمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp.	62
18	تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) و الفطر الممرض *F. culmorum* على محتوى نبات الباميا من عنصر النتروجين (%).	63
19	تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و و4 و 5) و الفطر الممرض *F. culmorum* على محتوى نبات الباميا من عنصر البوتاسيوم.	64
20	تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) و الفطر الممرض *F. culmorum* على محتوى نبات الباميا من عنصر الفسفور.	65
21	تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في هذه الدراسة على محتوى نبات الباميا من هرمون الابسيسك اسد (Abscisic acid) و هرمون الجبرلين (Gibberellic acid).	70
22	تأثير المبيد الكيميائي Topsin M (0.25 غم/ لتر) على نمو الفطر نوع (5) *T.asperelloides* و الفطر الممرض *F. culmorum* في أطباق بتري.	71
23	تأثير المبيد الكيميائي Topsin M و أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في إنبات بذور نبات الباميا في الاصص البلاستيكية.	74

1- المقدمة (Introduction)

تعود الباميا (*Abelmoschus esculentus* L.) إلى العائلة الخبازية (*Malvaceae*) و هي من محاصيل الخضر الصيفية المهمة التي تزرع في المناطق الحارة والدافئة في دول اسيا و أفريقيا (Hayamanesh، 2018) و تسمى بعدة أسماء منها Gumbo و Ladyfinger و okra و Bamhia (Bohnert، 2008; Kaur و اخرون، 2013). تحتوي ثمار الباميا على المواد الكربوهيدراتية و البروتين و الألياف و الدهون و الأملاح المعدنية كالكالسيوم و الحديد و الفيتامينات مثل A و C و P و B1 و B2 (الركابي و جاسم، 1984; Kendall و آخرون، 2004 ;Pitchaimuthu، 2012) كما انها تحتوي على الحديد و المنغيز و الزنك و نسب متفاوتة من الزيت (Moyin-Jesu، 2007; Gemede و آخرون، 2015). لثمار الباميا قيمة طبية في معالجة القرحة و التخفيف من البواسير و اضطرابات الجهاز البولي و تنظيم ضغط الدم، كما ان استخدم صمغ الثمار كبديل للبلازما و استغلال قابليته على الارتباط بالكوليسترول و حمض الصفراء و بعض السموم التي يطرحها الكبد (Singh و آخرون، 2014).

عالمياً، بلغت المساحة المزروعة لمحصول الباميا حوالي 946 ألف هكتار و بإنتاجية وصلت إلى خمسة مليون طن (FAOSTAT، 2004) و ازداد هذا الانتاج في عام 2019 ليصل إلى تسعة مليون طن (FAOSTAT، 2019). اما في العراق، تزرع الباميا في شهر اذار و نيسان، و بلغت المساحة المزروعة لمحصول الباميا لسنة 2020 حوالي 64146 دونم و بمعدل انتاجية بلغ 93719 طن (وزارة التخطيط الجهاز المركزي للاحصاء، 2020). كبقية المحاصيل الزراعية الأخرى، يتعرض محصول الباميا إلى مهاجمة العديد من الآفات الزراعية و تعتبر أمراض الذبول من اخطر الأمراض التي تصيب محصول الباميا التي تسببها فطريات *Pythium* spp. و *R. solani* و *Fusarium* spp. التي تصيب نبات الباميا في جميع مراحل نموه مسببة تعفناً للبذور و موت البادرات (Muimba-Kankolongo، 2018). و كذلك تصاب بمسببات اخرى منها مسببات أمراض النبات مثل الفطريات (*Fusarium* spp.) و الفايروسات مثل (*Okra mosaic virus*) و نيماتودا تعقد الجذور (Root-knot nematodes) و غيرها (Gemedeو آخرون، 2015). تعد الفطريات و منها أنواع الفطر *Fusarium* spp. من المسببات المرضية التي تؤثر على نبات الباميا كماً و نوعاً و تسبب ذبول و موت النبات و غيرها من المسببات المرضية التي تسبب خسائر اقتصادية لا يستهان بها مما يدفع المزارعون إلى استخدام المبيدات الكيميائية باعتبارها الحل الاسرع و الاكفأ في السيطرة على المرض (Maitlo و آخرون، 2019). و لا يخفى على المختصين بدراسة الآفات الزراعية و منها مسببات امراض النبات المختلفة بالآثار السلبية للاستخدام غير المبرمج للمبيدات الكيميائية لما تمتلكه من تأثيرات سلبية على صحة الانسان و الحيوان و النبات، فضلا عن

دورها بالاخلال في التوازن الاحيائي من خلال التأثير الايجابي أو السلبي على الكائنات الغير مستهدفة بالاضافة إلى دورها في ظهور صفة المقاومة لدى العديد من الافات (Herrera-Téllez و آخرون، 2019). بدأ الباحثون باللجوء إلى طرائق اكثر اماناً للبيئة حفاظاً على صحة الكائنات الحية باختلاف أنواعها و منها استخدام بعض الاحياء المجهرية مثل الفطريات و البكتريا في مقاومة مسببات امراض النبات و امكانية ادخالها في برامج مكافحة متكاملة مع المبيدات الكيميائية للتقليل من استخدام التراكيز العالية لتلك المبيدات (Hossain و آخرون، 2015). هناك العديد من أنواع الفطريات مثل الأنواع التابعة للفطر *Trichoderma* spp. (Hossain و آخرون، 2015; Herrera-Téllez و آخرون، 2019)، و منهـــا *Trichoderma harzianum* و*Trichoderma asperelloides* و *Trichoderma atroviride* و *Trichoderma longibrachaitum* التي استخدمت في مقاومة العديد من الفطريات الممرضة مثل *Fusarium brachygibbosum* و *Rhizoctonia solani* (فالح، 2020; الاسدي، 2020). تعتبر بعض أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و منها *Trichoderma pseudokoningii* و *Trichoderma polysporum* و *T. harzianum* عوامل مكافحة حيوية فعالة لمكافحة لأمراض الفطرية، و تعتبر آمنة و صديقة للبيئة و أستخدمت على نطاق واسع ضد مسببات الأمراض النباتية بما في ذلك الفطر *Fusarium* spp. (Maitlo و آخرون، 2019). نظراً للأهمية الاقتصادية لنبات الباميا و الاضرار المتسببة من بعض الفطريات، فقد هدفت هذه الدراسة الى:

1- العزل و التشخيص المظهري و الجزيئي للفطر الاكثر امراضية من بين الفطريات المعزولة في هذه الدراسة من جذور نباتات الباميا المصابة.

2- اختبار فعالية المبيد الكيميائي Topsin M و أنواع مختلفة من الفطر *Trichoderma* spp. في مقاومة الفطر الممرض *F. culmorum*.

3- ايجاد افضل صيغة تكاملية فعالة بين المبيد الكيميائي Topsin M و أنواع من الفطر *Trichoderma* spp. في مقاومة الفطر الممرض *F. culmorum*.

4- تصنيع مبيد حيوي بأنواع مختلفة من الفطر *Trichoderma* spp. لمقاومة الفطر الممرض *F. culmorum*.

2-مراجعة المصادر Literature review

2-1 أهمية محصول الباميا

الباميا (*A. esculentus* (L.) Moench) من محاصيل الخضر العائدة إلى العائلة الخبازية (*Malvaceae*)، موطنه الاصلي إثيوبيا و السودان و دول شمال شرق إفريقيا (Ndunguru، 2004; Singh و آخرون، 2014). تزرع الباميا من أجل قرونها الخضراء التي تستخدم إما مطبوخة أو مجففة أو معلبة أو مجمدة، اضافة إلى استخدام قرونها في بعض البلدان كبديل للقهوة (Moekchantuk و Kumar، 2004). تعتبر الباميا من محاصيل الخضر الغنية بالبروتين (0.2 غرام) و الكربوهيدرات (8.2 غرام) و دهون (0.20 غرام) و ألياف (1.70 غرام) و كالسيوم (84 ملغرام) و حديد (1.20 ملغرام) و كاروتين (185 ميكرو غرام) و ريبوفلافين (0.08 ملغرام) و ثيامين (0.04 ملغرام) و حمض الأسكوربيك (47 ملغرام. بروتين (4.4 غرام) في 100 غم باميا طرية (Dilruba و آخرون، 2009). تحظى الباميا بشعبية واسعة في شبه القارة الهندية الباكستانية، ففي الهند، تحتل الباميا المرتبة الأولى في استهلاكها (Kumar، 2013)، و لثمار الباميا أهمية طبية من خلال علاج حالات اضطراب الجهاز البولي و التناسلي و الحيوانات المنوية و معالجة حالات القرحة و البواسير (Olaniyan و Omoleyomi، 2013). اضافة إلى انها تعد كمصدراً للزيت الذي يتواجد بنسبة تتراوحت بين 20% - 40%، كما انها تحتوي على حمض Tryptophan على شكل أحماض دهنية غير مشبعة، فضلا عن احتوائها على ألياف غير قابلة للذوبان تحافظ على صحة الأمعاء، كما و تحتوي بذور الباميا على الزيت الذي يتكون من حمض اللينوليك بنسبة قد تصل إلى 47.7% (Gemede و آخرون، 2015). كما تستخدم بذورها الناضجة المحمصة كبديل للقهوة أما الجذور و السيقان فهي غنية بالألياف القابلة للذوبان و فيتامين B6 و حمض الفوليك، و تمنع الامساك بفضل أليافها القابلة على امتصاص الماء (Pitchaimuthu و اخرون، 2012). نظرا لأهمية محصول الباميا فقد توسعت زراعتها بشكل كبير و صاحب هذا التوسع التعرض إلى العديد من الأمراض منها تعفن الجذور و الذبول التي سببت خسائر كبيرة بالمحصول (Weller وآخرون، 2002; Nasreen و آخرون، 2019). بلغت المساحة المزروعة.

2-2 أهم الآفات التي تصيب محصول الباميا

تعتبر أمراض الذبول من اخطر الأمراض التي تصيب محصول الباميا التي تسببها فطريات *Pythium* spp. و *R. solani* و *Fusarium* spp. التي تصيب نبات الباميا في جميع مراحل نموه مسببة تعفناً للبذور و موت البادرات (Muimba-Kankolongo، 2018). كما و تصاب الباميا بالعديد من الآفات الحشرية مثل نطاق الأوراق (*Amrasca biguttula*) و المن (*Aphis gassypii*) و الذباب الأبيض (*Bemisia tabaci*) و الحلم (*Tetranychus cinnabarinus*)، و الأمراض الفطرية منها

Macrophomina phaseolina و *Fusarium solani* و *Rhizoctiona solani* و *Fusarium oxysporum* (Anitha، 2008).

هناك العديد من المسببات المرضية المختلفة التي تهدد نمو نبات الباميا و منها فيروس *Yellow vein mosaic virus* (BYVMV) وهو من أهم الأمراض الفيروسية الخطرة التي تصيب محصول الباميا في جميع مراحل النمو مسببا خسائر كمية و نوعية تتراوح بين 50%-100% (Rashid و آخرون، 2002; Solankey و آخرون، 2014; Appiah و آخرون، 2020). يعد فايروس *Okra enation leaf curl virus* أيضاً من الفايروسات الخطرة التي تصيب نبات الباميا حيث يسبب تجعداً لأوراقها و فظاً واضحاً في انتاجية النبات كماً و نوعاً (Chandan و آخرون، 2013).

3-2 الأهمية الاقتصادية لمرض تعفن البذور و موت البادرات

يعاني نبات الباميا في العراق من خسائر كبيرة في الإنتاج كماً و نوعاً بسبب بعض العوامل الاحيائية و غير الاحيائية (Imran و آخرون، 2020). بشكل عام، ان الخسائر الناتجة عن تعفن البذور و موت البادرات تتمثل بالتكلفة المباشرة المتعلقة بالضرر الحاصل في البذور أو البادرات، اما التكلفة غير المباشرة فتتمثل بالتكاليف الاضافية الناتجة عن إعادة الزراعة في أماكن البذور و البادرات التي فشلت بالإنبات و النمو. تلعب المسببات المرضية التي تنتقل بواسطة التربة مثل الفطريات *R. solani* و *F. solani* و *Pythium* spp. دوراً رئيسياً في تعفن بذور و جذور النبات مسببة خسائر كبيرة لكونها تعيش بعيدة عن منظور الإنسان و لا تظهر أعراضها إلا بعد حدوث الضرر التام لبذور و جذور النباتات (Kapadiya و آخرون، 2014). للعديد من الفطريات مثل *R. solani* و أنواع من الفطر *Fusarium* spp. القابلية على البقاء لفترات طويلة بغياب العائل الحساس و مقاومة الظروف البيئية المتطرفة بسبب تكوينها لأطوار مقاومة مثل الأجسام الحجرية (Sclerotia) و الابواغ الكلاميدية (Chlamydospores) (Alhussaini و آخرون، 2016; Šišić و آخرون، 2018). كما أن بعض الفطريات مثل *R. solani* و *F. solani* تعد من الفطريات الشديدة الامراضية و تؤدي إلى انخفاض كبير في إنبات البذور للعديد من محاصيل الخضر بما في ذلك الخيار و الطماطة و الباميا (Al-Fadhal و آخرون، 2018; Begum و اخرون، 2005). يرجع التباين في النسب المئوية لعفن البذور و موت البادرات المتسبب عن أنواع مختلفة من الفطريات او العزلات ضمن النوع الواحد إلى الاختلاف في ضراوتهما و سرعة نموها و نوع و كمية المواد المنتجة منها مثل السموم و الانزيمات المحللة (Desvani و آخرون، 2018).

للفطر *Fusarium culmorum* تأثير كبير على الانتاج بسبب تعفن البذور و الساق و الجذور المعروف باسم التعفن التاجي الفيوزارمي (FRR،Fusarium root rot) مؤدياً إلي تعفن البذور و موت البادرات قبل أو بعد الانبات (Scherm و آخرون، 2013). يسبب الفطر *F. culmorum* خسائر تصل

إلى 26% في القمح و 18% في الشعير، فضلا عن دورة في تلوث الحبوب بالسموم الفطرية مثل Trichothecenes و Zearalenone و Fusarins (Kammoun وآخرون، 2010; Chekali وآخرون، 2013).

4-2 الفطر *F. culmorum*

تم وصف الفطر *Fusarium* spp. لأول مرة من قبل Link سنة 1809، ينتمي الفطر *Fusarium* spp. إلى شعبة الفطريات الكيسية Ascomycota، تحت شعبة (Pezizomycotina) ضمن رتبة Nectriaceae (Leslie و Summerell، 2006) و كما موضح ادناه:

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Class: Sordariomycetes

Subclass: Hypocreomycetidae

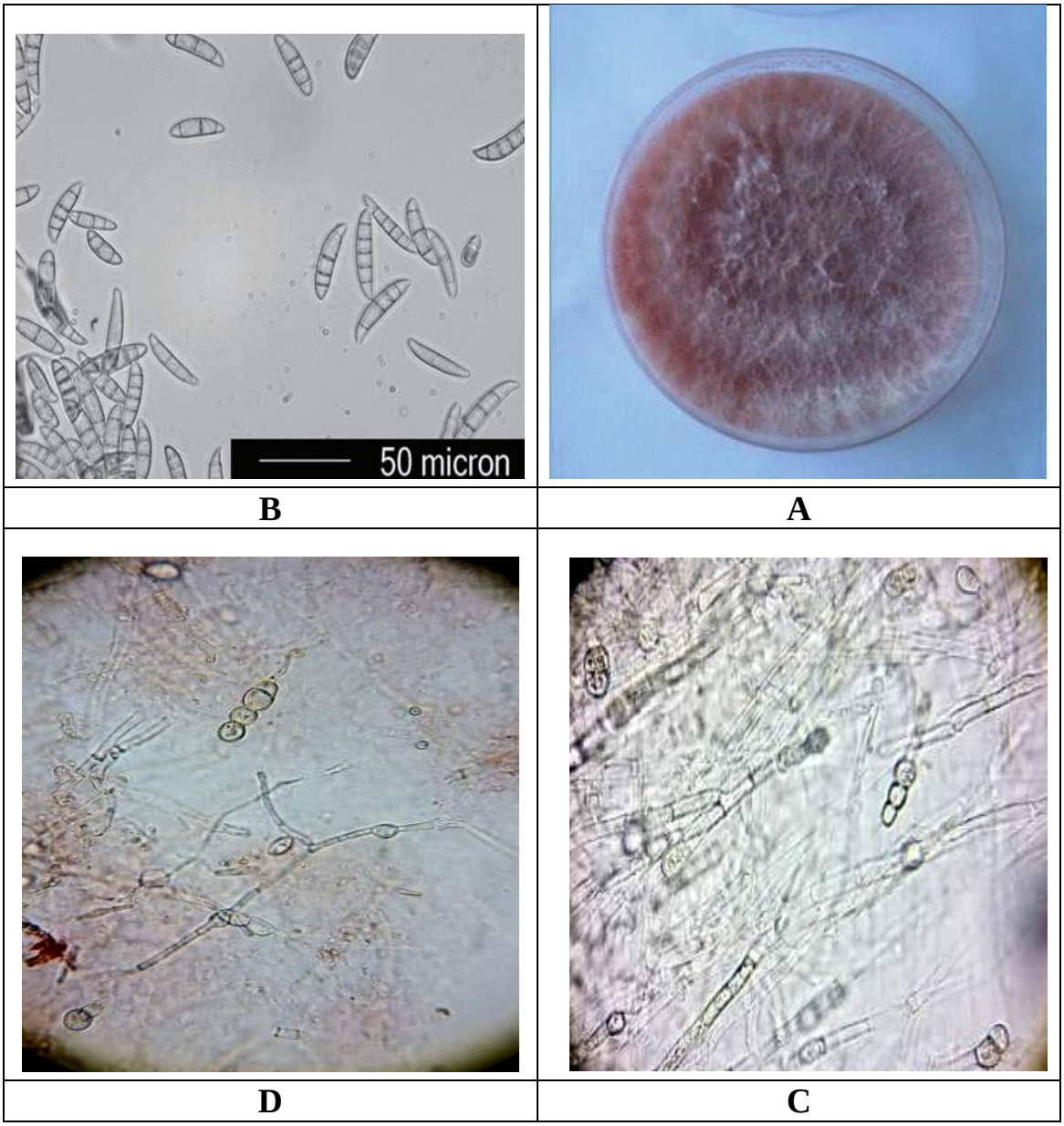
Order: Hypocreales

Family: Nectriaceae

Genus: *Fusarium*

Species: *culmorum*

مستعمرة الفطر *F. culmorum* تنمو سريعا على وسط البطاطا دكستروز اكر (Potato dextrose agar،(PDA) ، تتلون في البداية بلون ابيض إلى اصفر لتتحول في النهاية إلى لون بني محمر (Leslie و Summerell، 2006). الابواغ الصغيرة (Microconidia) لا وجود لها، في حين الابواغ الكبيرة (Macroconidia) فهي تتواجد بغزارة و تكون ذات نهايات مدببة و عريضة في المنتصف و بجانب ظهري منحني نوعا ما، اما الجانب الداخلي فهو مستقيم تقريباً. اما السبورات الكلاميدية (Chlamydospores) فهي تتكون بغزارة و بسرعة خلال 3-5 اسابيع على خيوط الفطر. السبورات الكلاميدية (Chlamydospores) سميكة الجدران و كروية في المظهر و تتواجد بشكل مفرد او مجموعات او سلاسل و بأحجام تتراوح بين 9-14 نانوميتر (Leslie و Summerell، 2006).



شكل (1) بعض الصفات المظهرية للفطر *F. culmorum*. (A) مستعمرة الفطر *F. culmorum* على وسط البطاطا الدكستروز اكار(PDA); (B) الابواغ الكبيرة (Macroconidia); (C) الغزل الفطري (Mycelium); (D) الابواغ الكلاميدية (Chlamydospores).

يسود وجود الفطر *F. culmorum* و تزداد مخاطره في المناطق الأكثر برودة مثل شمال و وسط وغرب أوروبا ليصيب مجموعة واسعة من العوائل النباتية التابعة لذوات الفلقة الواحدة و الفلقتين و منها محاصيل الحبوب مثل القمح (*Triticum astivum*) و الشعير (*Hordeum vulgare*) و الشوفان (*Avena sativa*) و الذرة (*Zea mays*) و كذلك بعض النباتات العشبية. في دراسات سابقة عزل الفطر من نباتات مختلفة و منها بنجر السكر (*Beta vulgaris*) و الكتان (*Linum usitatissimum*) و القرنفل (*Syzygium aromaticum*) و الباقلاء (*Vicia faba*) و البازلاء (*Pisum sativum*) و الهليون

(*Asparagus officinalis*) و البرسيم الأحمر (*Trifolium pretense*) و الكراث (*Allium ampeloprasum*) و الشيليك (*Fragaria x ananassa*) و درنات البطاطا (*Solanum tuberosum*) (Scherm و آخرون، 2013). في حال عدم توفر الظروف البيئية غير الملائمة و غياب العائل الحساس، يبقى *F. culmorum* في مخلفات النباتات المصابة بشكل سبورات كلاميدية (Clamydospores) و التي لها القابلية على المكوث في التربة لحوالي أربع سنوات (Cook، 1980)، أو بقاءه كغزل فطري في بقايا الحبوب (Khemir و آخرون، 2018). *F. culmorum* هو فطر واسع الانتشار ينتقل عن طريق التربة يسبب تعفن الجذور والساق ولفحة رأس الفيوزاريوم على مختلف الحبوب الصغيرة و لاسيما القمح و الشعير، و يسبب خسائر بشكل كبير بنوعية الحبوب و كميتها من خلال تلويثها بالسموم الفطرية (Scherm و آخرون، 2013). يعد تلوث الحبوب الصغيرة بأبواغ الفطر *F. culmorum* مصدراً مهما لمركبات Trichothecenes و Zearalenone و غيرها من السموم الفطرية التي تسبب أمراضاً خطيرة للإنسان كما يعد الفطر *F. culmorum* أحد مسببات الأمراض المهمة للقمح مسبباً تعفن منطقة التاج في النبات و لفحة الرأس (Fusarium head blight, FHB) (Khemir و آخرون، 2020).

2-5 تشخيص الفطريات

2-5-1 التشخيص المظهري للفطريات

تعد الفطريات من الكائنات المنتشرة في كافة النظم البيئية و بأعداد قد تصل إلى خمسة أمثال أعداد أنواع النباتات، كما أن كثير من البلدان تفتقر إلى التعريف الدقيق للفطريات و هذا يعكس الرأي العام العالمي بأن حوالي 95٪ من أنواع الفطريات ما زال مجهولا و منتظرا الكشف عنه (Hawksworth و آخرون، 1996; Yang و آخرون 2007). يعتمد تشخيص الفطريات مظهرياً على عدة صفات (Morphological characteristics) مثل ألوان و أشكال و كثافة مستعمراتها على وسط التنمية بالإضافة إلى أشكال و أحجام و ألوان الابواغ المكّونة لها (Hermosa و آخرون، 2000; Monte، 2001; Chaverri و Samuels، 2001). في العديد من الدراسات شخصت فطريات مختلفة إلى مستوى النوع و السلالة و منها فطريات تابعة للجنس *Fusarium* spp. اعتماداً على بعض الصفات المميزة للفطر مثل لون و شكل الأبواغ الكونيدية كونها مقسمة أو غير مقسمة وعدد الحواجز المكّون لها و كذلك موقع الابواغ الكلاميدية (Howard، 2003). وصف Sefiert (1996) بعض الصفات المظهرية للفطر *Fusarium* spp. النامي على وسط الغذائي البطاطا دكسروز اكر (Potato dextrose agar, PDA) بكونها مستعمرات ذات نمو قطني و بألوان مختلفة منها ما يتدرج من اللون الابيض إلى اللون الوردي أو البني بتقدم العمر، كما ان مستعمراتها متوسطة إلى سريعة النمو ذات حواف منحنية أو متعرجة.

ان الحاجة إلى التشخيص الدقيق للفطريات يعد من الحاجات الملحة لأهميته في الوصول إلى طرائق سريعة و كفؤة في إدارة الامرض و الأضرار الناتجة عنها. لوحظ في دراسات سابقة أن الاعتماد على الصفات المظهرية (Morphological characteristics) في تصنيف الفطريات قد يعطي نتائج دقيقة أحياناً إلا ان الكثير من الباحثين لا يعول على تلك الصفات كونها تتطلب من القائم بعملية التشخيص خبرة كافية و خاصة في المجاميع الفطرية القريبة الشبه فيما بينها مثل أنواع الفطر *Fusarium* spp.، اضافة إلى احتياجها إلى وقت و جهد كبيرين، فضلا عن كونها غير دقيقة في كثير من الأحيان بسبب تأثرها بعوامل البيئة التي تؤثر على حجم و أشكال و ألوان الابواغ و المستعمرات الفطرية (Cairns و آخرون، 2018).

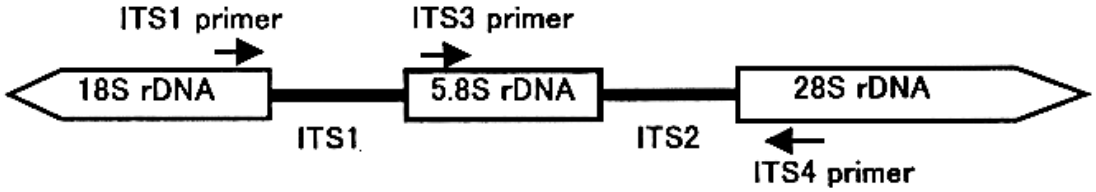
2-5-2 التشخيص الجزيئي للفطريات

تعد تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل للبوليمريز (Polymerase chain reaction, PCR) واحدة من التقانات الجزيئية المعتمدة على انتخاب و تضخيم منطقة محددة من جينوم الكائن الحي و بالاعتماد على الاختلافات الموجودة في تسلسل الحامض النووي (DNA) لتلك المنطقة و بالتالي معرفة العلاقات الوراثية من حيث التشابه و الاختلاف بين الكائنات المختلفة و منها الفطريات و التي ستعطي دعما للتشخيص المظهري للفطر المدروس (Nayaka و آخرون، 2008; Al-Sanae و آخرون، 2016).

الأمراض المنقولة عن طريق التربة تتسم بصعوبة خاصة للتشخيص المظهري لأن بيئة التربة كبيرة للغاية ، ومعقدة، مما يشكل تحدياً لفهم جميع جوانب الأمراض المنقولة بالتربة. وعلاوة على ذلك، يمكن أن تكون الأمراض المنقولة عن طريق التربة كالكلاميديا خلال مراحل الإصابة الأولى، تعتمد على عوامل الإجهاد البيئي، و بعض فترات طويلة كامنة تؤدي إلى تأخر تشخيص المظهري. و قد وضعت العديد من مسببات الأمراض المنقولة عن طريق التربة هياكل البقاء على قيد الحياة، مثل جراثيم المتخصصة أو خيوط فطرية، التي يمكن أن تعيش في التربة لسنوات عديدة حتى في غياب مضيفيهم. المعرفة بوجود مسببات المرض من خلال استراتيجيات الكشف الجزيئي تلعب دوراً مفيداً بإبلاغ القرارات في الوقت المناسب فيما يتعلق بالعلاج في مرحلة مبكرة أو النباتات قبل تقييمات للحقول.

أن تحديد درجة التشابه و الاختلاف الوراثي إلى مستويات تصنيفية وراثية قد تكون بين الأنواع التابعة لجنس واحد او اجناس و باعتماد نواتج تفاعل البلمره الجزيئية يعرف بالتنميط الوراثي (Genotyping) (Hey، 2001). نظراً لأهمية تشخيص و تصنيف الفطريات، كان لابد من التفكير بإيجاد نظام تصنيفي متقدم أو شفرة وراثية (Barcoding DNA) التي تمثل طريقة تصنيفية سهلة و سريعة تستخدم فيها واسمات جينية (Genetic marker) ضمن جينوم الكائن الحي (Chu و آخرون، 2006). أسهمت الاختلافات المتواجدة في المنطقة الجينية المعروفة بالـ ITS (Internal transcribed

(spacer (شكل 2) و بالتحديد على الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين (rDNA) في الكائنات الحية الحقيقية النواة دورا مهماً و دقيقاً في تشخيص تلك الكائنات و منها الفطريات مثل *Fusarum proliferatum* و *Cladosporium* spp. و *Fusarium* spp. (Al-Fadhal و آخرون، 2018; Al-Sharmani و آخرون، 2019). كان للتعرف على هذه المنطقة الجينية (ITS) أهمية كبيرة في اكتشاف طريقة دقيقة في تشخيص الفطريات إلى مستوى النوع أو السلالات التابعة لنوع أو أنواع مختلفة و كذلك فهم العلاقة الوراثية (Phylogeny) بين تلك الأنواع أو السلالات (Conrad و آخرون، 2012). استخدمت تسلسلات القواعد النيتروجينية المتواجدة في منطقة الـ ITS و بالتحديد في المناطق المحافظة (Conserved genetic regions) التي تخلو من الاختلافات في تلك التسلسلات في تصميم بادئات عامة (Universal PCR primers) ذات كفاءة عالية في عملية تضخيم الحامض النووي (PCR amplification) و استخدامها في تشخيص العديد من الفطريات مثل *Trichoderma* spp. و *Penicillium* spp. و *Fusarium* spp. و *Aspergillus* spp. و *R. solani* (Seifert و آخرون، 2007; Al-Fadhal و آخرون، 2018).



شكل (2) مناطق الـ ITS المتواجدة على الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين (rDNA) المستخدمة في تشخيص الفطريات.

2- 6 مكافحة الفطريات المسببة لأمراض النبات

2-6-1 المكافحة الكيميائية

تعتبر المكافحة بواسطة المبيدات الكيميائية الوسيلة الاكثر استخداماً في العالم بالرغم من الاضرار التي تسببها للبيئة والكائنات الحية غير المستهدفة و ذلك لكونها سهلة التطبيق و تعطي نتائج واضحة و سريعة و يمكن تطبيقها في مختلف البيئات (AL-Musawi، 2012). ففي الولايات المتحدة الاميركية شكلت المكافحة الكيميائية حوالي 70% من طرائق المكافحة الاخرى المستخدمة في مكافحة المسببات المرضية الفطرية (Nesmith، 2001). رغم مخاطر المبيدات الكيميائية البيئية و الصحية للإنسان و الحيوان و النبات الا انها ما زالت الحل الأكفأ و الاسرع في تقليل او منع الضرر الناتج من الافات الزراعية و منها مسببات امراض النبات مثل الفطريات و البكتريا و النيماتودا و غيرها (Benitez و آخرون، 2004; Sun و Liu، 2006; Rani و آخرون، 2020).

يعد المبيد الكيميائي Topsin M 70% من المبيدات الجهازية العائدة لمجموعة الكاربامات (Carbamates) و مادته الفعالة هي Thiophanatemethyl و له فعالية في مكافحة العديد من مسببات مرض موت و سقوط البادرات و منها الفطر *Fusarium oxysporium* f. *lycopersicum* (الناصري و آخرون، 2017). أن لأستخدام المبيد Topsin M كفاءه عالية في خفض معدل الاصابة بمرض الانثراكنوز (Anthracnose) في اشجار الخوخ عند استخدامه رشا بمعدل 100 مايكروغرام/ ملم (Hu و آخرون، 2015). كما أثبت Butt و آخرون (2011) ان استخدام المبيد Topsin M رشا على المجموع الخضري لأربعة اصناف من الرز (*Oryza sativa*) ادى و بشكل معنوي في خفض شدة الاصابة بالفطريات.*Helminthosporium* spp و .*Curvularia* spp و.*Alternaria* و *Fusarum moniliforme*.

2-6-2 استخدام الفطر .*Trichoderma* spp في المكافحة الاحيائية

ينصب التوجه في الوقت الحاضر إلى استخدام المكافحة الحيوية كطريقة امنة للإنسان و الحيوان و النبات و كطريقة بديلة عن المبيدات الكيميائية لما تمتلكه من مشاكل بيئية و صحية فضلا عن ظهور صفة المقاومة لدى الافة المستهدفة خصوصا عند استخدامها بتراكيز غير قاتلة (Sub-killing concentrations)، استغلت العديد من الفطريات و منها الفطر .*Trichoderma* spp و الفطر .*Paecilomyces* spp بكفاءة عالية في مكافحة الكثير من الحشرات و مسببات امراض النبات الفطرية (Sebastian و 2006; Fiedler و Sosnowska، 2007).

تعيش أنواع الفطر .*Trichoderma* spp معيشة حرة في التربة و لها دور في تشجيع نمو النباتات و تحسين مؤشرات النمو الخضري و الجذري و زيادة الإنتاج كماً و نوعاً (Ranasingh و آخرون، 2006; Topolovec-Pintarić، 2019). وجد أن بعض أنواع .*Trichoderma* spp لها أمكانية العيش في خلايا النبات دون أن تحدث لها أثاراً سلبية و إنما لها دورا ايجابيا في تشجيع نمو و تطور النبات و بناء وسائلة الدفاعية فضلا عن إمكانيته في انتاج عدد واسع من الانزيمات و منها تلك المحللة لجدران خلايا الفطر الممرض بالإضافة إلى استحثاث المقاومة الجهازية للنبات ضد العديد من الفطريات الممرضة (Saldajeno و آخرون، 2014; Sood و آخرون، 2020). اثبتت بعض الدراسات ان 90% من تطبيقات المكافحة الاحيائية نفذت باستخدام عزلات مختلفة من الفطر .*Trichoderma* spp و التي تميز بعضها بكفاءة عالية تضاهي فعالية بعض المبيدات الكيميائية في مكافحة الكثير من الفطريات (Monte و آخرون، 2001; Ubalua و Oti، 2007; Poveda و آخرون، 2020).

وجد Kilonzi و آخرون (2020) ان للفطر *Trichoderma asperellum* كفاءة عالية في السيطرة على مرض اللفحة المتأخرة على الطماطة المتسببه عن الفطر *Phytophthora infestans* من

خلال تحفيزه للمقاومة الجهازية في النبات و زيادة محتواه من الفينولات و حامض السالسليك و كذلك زيادة فعل بعض الانزيمات الدفاعية مثل Peroxidase و Oxidase و Lipoxygenase (Mohamed و آخرون، 2020). يعود سبب نجاح الفطر *Trichoderma* spp. كعامل مكافحة احيائية إلى قدرته العالية على التكاثر و التأقلم و البقاء تحت ظروف بيئية غير مناسبة و كفاءته في استخدام بعض العناصر المعدنية اضافة إلى تحسين خواص التربة و تعديل محيط الجذر و مكافحة الفطر الممرض من خلال تحفيز اليات دفاع مختلفة في النبات (Sariah و آخرون، 2005; Singh و Islam، 2010).

وجد ان معاملة بذور بعض النباتات مثل الباميا و الطماطة بالفطر *T. harzianum* ادى إلى توفير حماية كاملة من الاصابة بالفطريات *Fusarium oxysporum* و *M. phaseolina* و *Fusarium solani* و بكفاءة لم تختلف معنوياً عن بعض المبيدات الكيميائية المستخدمة في نفس التجربة (Shafique و آخرون، 2015; Sain و Pandey، 2018). كما وفر الفطر *T. harzianum* حماية عالية ضد مرض تعفن بذور و موت بادرات الحمضيات من الاصابة بالفطر *R. solani* (Howell و آخرون، 2000). استخدم John و آخرون (2010) الفطر *Trichoderma viride* كعامل مقاومة فعال ضد مرض تعفن جذور نبات فول الصويا (*Glycine max* L.) الناجم عن الفطريات *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* و *Pythium arrhenomanes*. كما اثبت Afzal و آخرون (2013) ان استخدام الفطر *T. viride* بمفردة او مع البكتريا *Pseudomonas aeruginosa* قد أعطى نشاطاً معنوياً في مكافحة الفطريات *M. phaseolina* و *R. solani* و *F. solani* و *F. oxysporum* و النيماتودا *Meloidogyne javanica* التي تصيب جذور الباميا.

2-6-2-1 آليات عمل الفطر *Trichoderma* spp.

1– التنافس (Competition)

يمتلك الفطر *Trichoderma* spp. قدرة تنافسية عالية جدا بسبب سرعة نموه و تكاثره و هذه المواصفات جعلته يتنافس مع العديد من المسببات المرضية التي تفتقر لتلك المواصفات (Harman، 2006). ان نجاح عوامل المكافحة الحيوية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. يتوقف على قدرتها المثبطة لنمو فطريات التربة و البقاء تحت ظروف تنافسية شديدة جداً و النمو بسرعة و مقاومتها للعديد من المركبات السامة مثل مبيدات الاعشاب و الفطريات و الحشرات (Zafra و آخرون، 2015). تتنافس بعض أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على المواد الغذائية و منها عنصر الحديد من خلال انتاجها مواد كيميائية (Siderophores) ترتبط بالحديد و تمنع الاستفادة منه من قبل الفطريات الاخرى (Chet و Inbar، 1994; Azarmi و آخرون، 2011; Chen و آخرون، 2018).

2- استحثاث المقاومة الجهازية

يمتلك الفطر *Trichoderma* spp. قابلية على الارتباط بجذور النبات و النمو بين خلاياه دون ان يحدث لها اضرارا و كذلك قابليته على انتاج بعض المركبات الكيميائية التي تحفز نمو النبات و تعزيز نموه و مقاومته ضد المسببات المرضية من خلال انتاج Uxins و Flavonoids و Terpenoids و المشتقات الفينولية و Aglycones (Harman و آخرون، 2004 ; Conteras-Cornejo و آخرون، 2009; Bürger و Chory، 2019). استخدمت أنواع مختلفة من الفطر *Trichoderma* spp. بكفاءة عالية في تحفيز المقاومة الجهازية ضد العديد من المسببات المرضية كالفطريات و الفايروسات و البكتريا و النيماتودا (Elad و آخرون، 2000; Dana و آخرون، 2001; Hermosa و آخرون، 2012). ينتج الفطر *Trichoderma* spp. بعض الببتيدات و البروتينات و الانزيمات و كذلك بعض المركبات الواطئة الوزن الجزيئي التي تساهم في تحفيز الآليات الدفاعية في النباتات مما ينتج عنها زيادة في انتاج بعض المركبات الفينولية و الكحولية ذات التأثير التثبيطي للمسببات المرضية (Reino و آخرون، 2007).

يزداد انتاج بعض البروتينات المنتجة من قبل الفطر *Trichoderma* spp. عند التحسس بوجود المسبب المرضي و تحفيز النبات على تنشيط وسائلة الدفاعية ضد الممرض (Saenz-Mata و آخرون، 2012). ذكر نهال (2011) ان للفطر *Trichoderma* spp. قدرة في تحفيز المقاومة الجهازية في نبات اللوبيا من خلال زيادة فعالية انزيم Peroxidase و Cellulase ضد الفطر *M. phaseolina*. كما أثبت Ruocco و آخرون (2009) ان استعمار فطر *Trichoderma* spp. لجذور بادرات بعض النباتات في مراحل نموها المبكرة ادى إلى انتاج مركبات مضادة للمسببات المرضية و منها انتاج الانزيم Peroxidase. لاحظ Yuan و آخرون (2019) من خلال نتائج دراستة ان الفطر *Trichoderma longibrachiatum* له القدرة على زيادة انتاج Salicylic acid و Jasmonic acid في نبات الخيار (*Cucumis sativus* L.) عند زراعة النبات في تربة ملوثة بالفطر *T. longibrachiatum* انعكاس ذلك ايجابيا على زيادة طول الجذر و ارتفاع النبات و الوزن الرطب بسبب انتاجة لبعض الهرمونات النباتية. تبين ان معاملة بادرات البصل (*Allium cepa* L.) بالفطر *T. asperellum* ادى إلى حمايتها من الاصابة بالفطر *Sclorotium rolfsii* بسبب الاليات المختلفة للفطر الاحيائي و منها زيادة انتاج و نشاط بعض الانزيمات التي أثبتتها نتائج التحليل (Elsharkawy و اخرون، 2013). وجد Sawant و آخرون (2020) ان معاملة نباتات العنب (*Vitis vinifera* L.) بالفطر *Trichoderma asperelloides* قد وفر حماية ضد مرض البياض الدقيقي بسبب زيادة انتاج و نشاط بعض الانزيمات β-1،3-glucanase وCellulase و Amylase وProtease في الاوراق

.

3 – تعزيز نمو النبات (Promoting plant growth)

اشارت الكثير من الدراسات إلى امكانية الفطر *Trichoderma* spp. على اجتياح المنطقة المحيطة بجذور النبات و تكوين حاجز وقائي حول الجذور يمنع وصول و دخول الفطريات الممرضة إلى انسجة الجذور (Harman ، 2000). تنتج هذه الفطريات عدد من المستقبلات الثانوية مثل البيتيدات غير الرايبوسومية (Non-ribosomal peptides) و التربينويدات (Terpenoids) و البيرونات (Pyrones) و المركبات المشتقة من الإندوليك (Indolic) في منطقة الجذور، اذ تحفز تلك المركبات زيادة تفرع الجذر و تزيد الكتلة الحيوية للنبات نتيجة لانقسام الخلايا و تمايزها و استطالتها (Harman، 2000 و Conteras-Cornejo و آخرون، 2016). ينتج الفطر *Trichoderma* spp. ثلاثة أنواع من المركبات التي تشجع على زيادة مقاومة النبات للمسببات المرضية و تتمثل هذه المركبات في البروتينات التي تعمل عمل الانزيمات المحللة و لها القدرة على تحليل محتويات المسببات الممرضة و السكريات الاحادية و ببعض المركبات ذات الوزن الجزيئي القليل التي تتحرر من الاغشية الخلوية للفطر *Trichoderma* spp. (Harman و آخرون، 2004).

تتمثل فاعلية هذا الفطر في حماية الجذور من فعل الفطريات الممرضة مثل *R. solani* و *Pythium* spp. و *Fusarium* spp. و غيرها بتكوين غلاف واقي يحيط بجذور النبات (Johanne و اخرون، 2002). اكدت دراسات سابقة ان وجود الفطر *Trichoderma* spp. و استعماره لجذور النبات يساعد على انتاج بعض الانزيمات مثل Peroxidases و Chitinases و β-1.3-glucanase التي لها دور في مقاومة المسببات المرضية و استحثاث المقاومة الجهازية للنبات (Harman و اخرون، 2004 و نهال، 2011). تبين أيضاً إن وجود الفطر *Trichoderma* spp. على جذور النبات يشجع على زيادة امتصاص الماء و بعض العناصر الغذائية مثل المنغنيز و الفسفور و المغنسيوم و الكالسيوم و الفسفور و النيتروجين و الصوديوم و النحاس و الحديد و انعكاس ذلك ايجابيا على نمو النبات و زيادة مقاومته ضد المسببات المرضة من جهة و زيادة مؤشرات النمو الخضري و الزهري و الانتاج كماً و نوعاً(Yedidia و آخرون،2011; Azarmi و آخرون، 2011).

4– انتاج المضادات الحيوية و الانزيمات (Antibiosis و Enzymes)

للفطر *Trichoderma* spp. القابلية على انتاج بعض المضادات الحيوية و التي لها تأثيراً مباشراً في قتل أو تثبيط الكائنات المنافسة و من بين تلك المضادات الحيوية Peptaibols و Polyketides و Acetaldehyde و Steroids و Trichorzianines و Alamethicine و Trichodermin و Suzukacillin التي تعمل على تحلل او منع نمو الخيط الفطري للمسبب المرضي المنافس و تثبيط أتناجه للأبواغ (Harman، 2000; Dias و آخرون، 2012). ان انتاج مثل هذه المركبات يعتمد بشكل اساسي

على وفرة العناصر الغذائية مثل افرازات الجذور و وجود العناصر المعدنية في التربة و كذلك الظروف البيئية الملائمة (Jacobsen، 2006). تنتج معظم سلالات الفطر *Trichoderma* spp. مواد تمثيل سامة متطايرة و غير متطايرة تعيق نمو الكائنات الحية الدقيقة الممرضة، من بين نواتج التمثيل هي الاحماض Harzianic و Tricholin Alamethicins و Peptaibols (Vey و آخرون، 2001). يعد المضاد الحيوي Peptaibols المنتج من قبل الفطر *Trichoderma* spp. من الببتيدات ذات النشاط المضاد للميكروبات و منها البكتريا الموجبة لصبغة كرام و بعض الفطريات، و كذلك وجد ان استخدامها قد حقق زيادة في الاستجابة الدفاعية لنبات التبغ و خفض قابليته للإصابة بفيروس موزاييك التبغ (Wiest و آخرون، 2002).

كما ينتج الفطر *Trichoderma* spp. طيفا واسعا من الانزيمات مثل Glucanase و Cellulase الذي تعمل على تحليل جدران خلايا المسببات المرضية، ذلك لاحتوائها على المواد Chitine و Glucane و Protein مما يساعدها على الاختراق و بدء عملية التطفل (الحديثي، 2002). أشار Hermosa و آخرون (2012) أن انزيمات Cellulase و Proteases و Srineprotase و المنتج من قبل الفطر *Trichoderma* spp. له دور في تثبيط عمل بعض انزيمات المسبب المرضي التي يستخدمها في تحليل جدران خلايا النباتات.

5 – التطفل (Mycoparasitism)

يعد التطفل المباشر لأحد الفطريات على الآخر عملية معقدة جداً تتضمن أحداث متسلسلة من هجوم و اختراق و من ثم قتل للعائل (Harman و اخرون، 2004; Halifu و آخرون، 2019). يتطفل الفطر *Trichoderma* spp. على العديد من الفطريات الممرضة بسبب صغر اقطار خيوطة الفطرية (1.5- 3 مايكرون) مقارنة بأقطار خيوط الفطريات الممرضة (5- 7 مايكرون) مما يجعل الفطر *Trichoderma* spp. اكثر قابلية للالتفاف حول خيوط الفطر الممرض بشكل حلزوني مكونة تراكيب ضاغطة تساعد على اختراق جدران خلايا الفطر الاخر و بمساعدة بعض الانزيمات مثل 1)-β،glucanases-(6 و Proteases المحللة لجدر الخلايا و التي يحدث لها نشاط عالي اثناء عملية التطفل على الفطر الاخر و التي تنتهي بالقضاء عليه (الحديثي، 2002; Benítez و آخرون، 2004; Vinale و آخرون، 2009). ان اليات التطفل من قبل الفطر *Trichoderma* spp. تتضمن مرحلة التحفيز و التي يتم فيها اقتراب الفطر *Trichoderma* spp. من الفطر الممرض الذي يفرز مركبات تحث على تجاوب فطر المقاومة الاحيائية في حين تتجه هايفات عائله مباشرة نحوه، مع العلم أن طبيعة هذا التحفيز لم تعرف إلى الان. اما في المرحلة الثانية فان الفطر *Trichoderma* spp. يتعرف على الفطر الممرض بسبب

وجود Lectines حيث يتم الالتصاق عن طريق ارتباط Agglutinine للفطر الممرض مع بعض السكريات الموجودة في الجدار الخلوي للفطر *Trichoderma* spp. (Vinale و آخرون، 2009).

تتضمن المرحلة الاخيرة من التطفل التفاف خيوط الفطر *Trichoderma* spp. على طول خيوط الفطر العائل مكّونة نهايات تعرف بأعضاء الالتصاق (Aspersoria) و التي تخترق جدار خلية العائل بمساعدة بعض الإنزيمات المحللة مثل إنزيمات Cellulase و Chutinase و Pectinase و Glucanase بالإضافة إلى بعض المضادات الحيوية مثل Gliotassine الذي يشترك في الية التطفل الفطري (Chet و Inbar، 1994; Harman، 2000). أن التفاف خيوط الفطر *Trichoderma* spp. حول خيوط العائل يتطلب التعرف المسبق على D-glucose و D-manose التي هي عبارة عن سكريات تتواجد في الجدار الخلوي للفطر *Trichoderma* spp.

2-7 الاوساط التخمرية و المواد لحاملة المستعملة في تنمية و اكثار فطريات المقاومة الاحيائية

استخدمت العديد من الاوساط لتنمية و خزن فطريات المقاومة الاحيائية و تحميلها على مواد حاملة لغرض استخدامها كمبيدات احيائية بهدف تقليل او منع استخدام المبيدات الكيميائية و في السنوات الماضية تناولت العديد من الابحاث استخدام بعض المخلفات الزراعية كأوساط رخيصة لتنمية فطريات المقاومة الاحيائية و استخدامها كمبيدات احيائية و التي احتلت حوالي 5.80% من سوق مبيدات الافات المختلفة (Sala و اخرون، 2019).

تعد المخلفات الزراعية من افضل الاوساط لتنمية الفطريات و ذلك لاحتوائها على المتطلبات الغذائية وقدرتها على امتصاص الماء و توفير الرطوبة المناسبة للفطر بالإضافة إلى انها متوفرة و غير مكلفة (Santa و آخرون، 2005; De la Cruz Quiroz و آخرون، 2015). كما تتمتع الكثير من الفطريات المقاومة و منها الفطر *Trichoderma* spp. بقدرتها على انتاج مجموعة من الانزيمات المحللة للسليلوز و غيرها (Novy و آخرون، 2015). استخدمت اوساط مختلفة مثل مخلفات الرز و النخالة و مخلفات الذرة و القمح و نشارة الخشب او البذور لتنمية فطريات المقاومة الاحيائية و التي اثبتت كفاءتها بدرجات مختلفة في تنمية فطريات المقاومة الاحيائية (Paredes و آخرون، 2017).

استخدم Jenkins و آخرون (1998) الرز كأفضل وسط ملائم من بين اوساط اخرى كمخلفات الحنطة لتنمية سلالات مختلفة من الفطر *Trichoderma* spp. كما لاحظ Jin و آخرون (2016) و Omwango و آخرون (2013) ان افضل وسط لتنمية الفطريات *T. viride* و*aspergillus niger* هو بقايا نبيذ العنب ومخلفات الاناناس و نخالة القمح و الذرة. استخدم Zhang و Yang (2015) نخالة القش

و القمح كوسط لتنمية *T. harzianum*. كما استخدم الاسدي (2020) سعف النخيل و السماد الحيواني و القصب و البردي و زهرة النيل كأوساط تخمرية وكان سعف النخيل الافضل من بين تلك الاوساط. كما استخدم الاسدي (2020) و فالح (2020) الكاؤلين و كبريتات الكالسيوم و التالك و الرمل كمواد حاملة للقاح أنواع مختلفة من الفطر *Trichoderma* spp. و كان التالك الافضل من بين تلك المواد في المحافظة على حيوية الفطر حتى بعد مرور 180 يوماً من الخزن تحت ظروف المختبر و كذلك في درجة الحرارة 4 ْم. كما اشاروا إلى ان افضل طريقة لخزن المبيد الحيوي كانت باستخدام الاكياس الورقية قياسا بطريقتي الخزن باستخدام الاكياس البلاستيكية و العبوات البلاستيكية.

2-8 الانزيمات النباتية:

هناك العديد من الانزيمات التي تنتج في النبات و عندما يتعرض لعوامل اجهاد خارجية تؤثر على العديد من العمليات الحيوية و الفسلجية للنبات و منها اجهادات ناتجة عن عوامل غير احيائية مثل تغيرات الحرارة و نقص الماء و غيرها او عوامل احيائية كالفطريات و الفايروسات و البكتريا و التي ينتج عنها أنواع من الانزيمات منها الكاتاليز (Catalase) و البيروكسيديز (Peroxidase) لحماية النبات من عملية الاكسدة (صقر، 2019).

1- انزيم الكاتاليز (Catalase)

لوحظ الكاتاليز (Catalase) لأول مرة في عام 1818 من قبل العالم Louis Daguerre الذي اكتشف ان سبب تحلل مادة H_2O_2 (بيروكسيد الهيدروجين) هو مادة غير معروفة أطلق عليها اسم الكاتاليز (Catalase) و الذي لاحظه في العديد من النباتات و الحيوانات (Loew، 1900). الكاتاليز (Catalase) هو إنزيم شائع موجود في جميع الكائنات الحية تقريبًا المعرضة للأوكسجين (مثل البكتيريا و النباتات و الحيوانات) يلعب دورا في تحلل بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) إلى ماء و اوكسجين (Chelikani و آخرون، 2004; Apel و Hirt، 2004; Cuypers و آخرون، 2011). يعتبر انزيم الكاتاليز من الانزيمات المهمة في حماية الخلية من الأكسدة بواسطة أنواع الأكسجين التفاعلية، و بالمثل يحتوي الكاتاليز على أعلى معدل دوران لجميع الإنزيمات و بمعنى اخر يمكن لجزيء الكاتاليز الواحد تحويل ملايين جزيئات بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء و أوكسجين كل ثانية (Goodsell، 2004). تحتوي النباتات على آليات إنزيمية و اخرى غير إنزيمية معقدة قادرة على إزالة السموم من O_2- و H_2O_2 (Asada، 1999). أثبت Skamnioti و آخرون (2007) أن انزيم الكاتاليز ينتج ليساهم في كبح المسبب المرضي عن طريق إزالة بروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) و أيضاً له دور في الحفاظ على سلامة جدار الخلية (Tanabe و آخرون، 2011). كما وجد Youssef و آخرون (2016) عند التلقيح بفطر *T. harzianum* و *Serratia*

proteamaculans معاً لنبات معرض للإجهاد بواسطة *R. solani* ادى إلى تحفيز إنزيمات مضادة للاكسدة في النباتات المعرضة للإجهاد مثل الكاتاليز (Catalase) و البيروكسيديز (Peroxidase).

2- انزيم البيروكسيديز (Peroxidase)

يساهم البروكسيديز (Peroxidase, POD) في زيادة الاستجابات الدفاعية للنبات من خلال مقاومة الاكسدة و يساعد في تحليل بروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) المسبب للإجهاد النباتي (Minibaeva و Gordon، 2003; Sofo و آخرون، 2015). ينتشر انزيم البيروكسيديز POD في جدران الخلايا النباتية بعد تخليقه في سيتوبلازم الخلايا و يصنف هذا الانزيم ضمن مجموعة الانزيمات التي تحتوي على المعادن و منها الحديد الذي يعد من المعادن الداخلة بتركيبه على هيئة Ferriprotoporphyrin و التي تعد المجموعة التي تربط بالأحماض الامينية (seaki و آخرون، 1986). وجد Christopher و آخرون (2010) بأن معاملة نباتات الطماطة بالفطر *T. virens* و الفطر الممرض *F. oxysporum* f.sp. *lycopIersici* قد حفز النبات على انتاج بعض الانزيمات الدفاعية و منها انزيم البروكسيديز (POD).

2-10 الهرمونات النباتية

1- هرمون حامض الأبسيسيك (Abscisic acid)

ينتج حامض الأبسيسيك (Abscisic acid)،ABA عند تعرض النبات إلى اجهاد مائي أو ملحي أو درجة حرارة متطرفة مؤدياً حماية النبات من تلك الظروف غير الملائمة، و لحامض الأبسيسيك دوراً مهما في نمو و تطور النبات و كذلك يتحكم في كثير من العمليات الفسيولوجية مثل غلق الثغور و تشكيل الجنين و تكوين البذور و تكوين مخزون البروتين و الدهون و الإنبات و الشيخوخة و الدفاع عن الخلية ضد الميكروبات و الطفيليات (صقر، 2019). كما يعتبر حامض الأبسيسيك (ABA) من المواد المثبطة للنمو في النباتات و يعتبر من مسببات تساقط الأوراق و الثمار، كما يسبب سكون البذور و البراعم و يعمل على غلق ثغور الأوراق و تثبيط الإنبات في البذور (صقر، 2021).

يلعب حامض الأبسيسيك (ABA) دوراً هاماً في تكيف النبات للظروف البيئية، فمثلا عند ارتفاع الحرارة عن الحد المطلوب يعطي ايعازات تتمثل بتنظيم فتح و غلق الثغور، كما أن له تأثير في عمليات نمو النبات مثل نضج البذور و السكون و تثبيط الإنبات و التنظيم الضوئي و الشيخوخة و تثبيط الإزهار و له أيضاً وظيفة أساسية في حماية النبات من الاضرار الناتجة عن زيادة الاملاح و الجفاف و الإجهاد التناضحي (Finkelstein و اخرون، 2002 ; Mauch-Mani و Mauch، 2005; صقر، 2019). وجد في دراسة سابقة ان معاملة نبات Arabidopsis بالفطر *Trichoderma atroviride* أدت إلى حدوث زيادة معنوية في تركيز هرمون الأبسيسيك (ABA) في النباتات المعرضة للاجهاد (Contreras-Cornejo و آخرون، 2015).

2- هرمون الجبرلين (Gibberellin)

تعتبر الجبريلينات (Gibberellin) من المواد المحفزة لنمو النبات و يوجد منها أكثر من 60 نوعاً تختلف فيما بينها من حيث عدد ذرات الكربون و كذلك وجود أو عدم وجود مجاميع الهيدروكسيل (OH). للجبرلين دورا مهما في حياة النبات من خلال تشجيع انقسام الخلايا و استطالتها و انبات البذور و نمو الجذور و تحفيز الازهار (Sun و Gubler، 2004; Vera-Sirera و آخرون، 2016). وجد طه و ابراهيم (2010) ان اضافة الفطر *T. harzianum* و *T. viride* ادى إلى زيادة واضحة في مستوى هرمون الجبرلين و بفارق معنوي عن النباتات غير المعاملة.

3-المواد و طرائق العمل (Martials and Methods)

3-1 الأجهزة و الأدوات و المواد المستخدمة في الدراسة.

3-1-1 الأجهزة و الأدوات المستخدمة في الدراسة.

جدول1: الأجهزة و الأدوات المستخدمة في الدراسة.

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة	بلد المنشأ
1	المؤصدة (Autoclave)	LabTech	South Korea
2	الحاضنة (Incubator)	Memmert	Germany
3	غرفة العزل (Laminar flow hood)	LabTech	South Korea
4	ميزان حساس (Analytical balance)	Olympus	U.k
5	ثلاجة (Refrigerator)	Sarorius	Korea
6	انابيب اختبار(Test tubes)	Sigma	England
7	اطباق بتري (Petri-Dishes)	-	China
8	دوارق زجاجية مختلفة الاحجام (Flasks)	Unisonic	England
9	اوراق ترشيح دقيقة (Filter Papers)	Whatman	England
10	شرائح زجاجية واغطيتها (Slides and slide cover)	Whatman No.1	England
11	محقنة طبية (Medical syringe)	-*	England
12	جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل وملحقاته (Thermal cycler)	MWG Biotch	Germany
13	جهاز الترحيل الكهربائي (Gel electrophoresis)	،Shando Scientific co	U.K
14	فرن كهربائي (Microwave oven)	Memmert	Germany
15	**جهاز قياس الحرارة و الرطوبة (Thermohygrometer)**	-	China

16	جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometry)	Cecil	Frence
17	غرفة العزل (Laminar flow hood)	Lab Tech	South Korea
18	جهاز قياس الاس الهيدروجيني (pH-meter)	Philips	Holand
19	مناخل (Sieves)	Ogawa	Japan
20	ثاقب فليني (Cork borer)	Unisonic LTD	England
21	ماصات دقيقة (Micropipetes)	Unisonic LTD	England
22	جهاز طرد مركزي مبرد (Cooling centrifuge)	Labortechnik	Germany
23	جهاز مازج (Vortex mixer)	Heidolph	Germany
24	جهاز تسخين (Hot plate)	Photox	England
25	اصص بلاستيكية (Plastic pots)	-*	China
26	ورق المنيوم (Aluminum foil)	-	-
27	مدقة بلاستيكية (Micropestle)	-	-
28	جهاز فوتومتر اللهب الضوئي (Photoelectric flame photometer)	-	Germany
29	مطحنة كهربائية(Electric grinder)	Mammanlex	China
30	مجهر ضوئي مركب (Compound light Microscope)	Olympus	Japan
31	جهاز التقطير	G.F.L	Germany
32	حمام مائي (Water Bath)	Gallenhamp	England
33	جهاز (Gerhardt)	Gemini LAB	South Korea

*تعني الجهاز لا يحمل اسم الشركة المصنعة او بلد المنشأ.

3-1-2 الاوساط الزرعية و المواد الكيميائية المستخدمة في هذه الدراسة

جدول 2: المواد المستخدمة في الدراسة.

ت	اسم المادة	الشركة المصنعة	بلد المنشأ
1	اكار (Agar)	Himedia	India
2	وسط البطاطا دكستروز اكر الجاهز(PDA)	Himedia	India
3	ماء مقطر (Distilled water)	-*	Iraq
4	هايبوكلوريت الصوديوم (Sodium hypochlorite)	تجاري	Iraq
5	سكروز (Sucrose)	-	Iraq
6	كحول اثيلي (Ethanol)	الجود	Iraq
7	كليسرول (Glycerol)	BDA	England
8	كبريتات الكالسيوم ($CaSO_4$)	-	-
9	القطن و الشاش (Cotton & muslin)	BDH	England
10	كلوروفورم (Chloroform)	BDH	England
11	هيدروكسيد الصوديوم (NaOH)	BDH	England
12	حامض الهيدروكلوريك (HCl)	BDH	England
13	مبيد توبسن (Topsin M)	SA King	UK
14	حامض الكبريتيك المركز (H_2SO_4)	BDH	England
15	حامض البيروكلوريك ($HClO_4$)	BDH	England
16	مولبيدات الامونيوم	BDH	England
17	حامض الاسكوربك	BDH	England
18	*Chloramphenicol*	-	India
19	الميثانول (CH_3OH)	Exirco	China
20	هيدروكسيد الامونيوم (NH_3OH)	-	China
21	خلات الاثيل (Ethel acetate)	-	China
22	محلول الفوسفات الدارئ (KH_2PO)	-	-
23	الكوايكول Guaicaol (0.1%)	-	-
24	بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 0.15%	-	-
25	محلول البوتاسيوم الدارئ (Potassium phosphate buffer)	-*	-

*المادة لا تحمل اسم الشركة او بلد المنشأ.

3-1-3 الاوساط الزرعية المستخدمة في هذه الدراسة

3-1-3 -1 وسط البطاطا دكستروز الجاهز (P.D.A)

حضر هذا الوسط حسب توصيات الشركة المصنعة بإذابة 39 غم من مسحوق الوسط في لتر من الماء المقطر و تعقيمه بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121مْ و ضغط 15 باوند/ انج^2 لمدة 20 دقيقة. قبيل مرحلة التصلب، أضيف المضاد الحيوي كلورامفينيكول (Chloramphenicol) إلى الوسط بمعدل 50 ملغم/ لتر و صب في أطباق بتري لاستخدامه في عزل و حفظ و تنشيط الفطريات و تنفيذ التجارب.

3-1-3-2 وسط الآكار المائي Water Agar (W.A)

حضر هذا الوسط بإذابة 17 غم من الأكار في لتر من الماء المقطر و وزع على دوارق زجاجية و عقمت في نفس الظروف المذكورة في الفقرة 3-1-3-1. بعد انتهاء التعقيم، أستخدم هذا الوسط في اختبار القدرة الامراضية للفطريات قيد الدراسة.

3-1-3-3 وسط البطاطا سكروز السائل Potato Sucrose Broth (P.S.B)

حضر هذا الوسط بأخذ 200 غم من درنات البطاطا المقشرة، و المقطعة إلى قطع صغيرة و غليها بالماء المقطر المعقم لمدة 20 دقيقة. بعدها رشحت البطاطا بواسطة قطعة شاش للحصول على المستخلص الذي أضيف اليه 10غم من السكروز و اكمل الحجم إلى واحد لتر. مزج الخليط جيدا و وزع في دوارق زجاجية (حجم كل منها 500 مل) وغلقت فوهتها بالقطن و ورق الالمنيوم (Aluminum foil) لتعقيمها بواسطة جهاز المؤصدة تحت نفس ظروف التعقيم المذكورة اعلاه. بعد انتهاء التعقيم و قبيل مرحلة التصلب، اضيف اليها المضاد الحيوي (Chloramphenicol) بمعدل 50 ملغم / لتر و صبت في اطباق بتري للاستخدام المباشر او للحفظ في الثلاجة بدرجة حرارة 4 ْم. استخدم هذا الوسط في تحضير رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp.

3-2 مصدر الفطريات الممرضة و أنواع فطريات المقاومة المستعملة في هذه الدراسة *Trichoderma* spp.

3-2-1 مصدر الفطريات الممرضة المعزولة في هذه الدراسة

تم عزل الفطريات الممرضة خلال الموسم الزراعي الصيفي من جذور بعض نباتات الباميا التي لوحظ عليها ضعف عام في النمو متمثل بالاصفرار و التقزم والذبول، من بعض مزارع الباميا في محافظة كربلاء (عين التمر) و بابل (المسيب) و جلبت إلى مختبر فايروسات النبات التابع لقسم وقاية النبات/ كلية الزراعة/ جامعة كربلاء لغرض اجراء عملية العزل. غسلت الجذور بماء حنفية لحوالي 30 دقيقة لإزالة

الأوساخ و الأتربة العالقة بها ثم قطعت إلى قطع صغيرة. عقمت القطع النباتية بواسطة محلول هايبوكلوريت الصوديوم (NaClO 1%) من المحلول البخاري لمدة دقيقتين ثم غسلت بعدها بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات و تجفيفها بواسطة ورق ترشيح معقم. نقل حوالي خمس قطع إلى كل طبق من أطباق بتري حاوي على وسط البطاطا دكستروز اكار (PDA) و المضاف اليه المضاد الحيوي كلوروفينيكول (Chloramphenicol) (50 ملغم/ لتر). حضنت بعدها جميع الأطباق في درجة حرارة 25 ± 2 مْ لمدة ثلاثة أيام. بعد ظهور المستعمرات، نقيت الفطريات بأخذ جزء من حافة المستعمرة و نقلها إلى طبق بتري حاوي على نفس الوسط الغذائي و المضاد الحيوي و تحضينها في الحاضنة تحت نفس درجة الحرارة المذكورة اعلاه. شخصت الفطريات المعزولة مبدئياً بالاعتماد على بعض الصفات المظهرية باستخدام المفاتيح التصنيفية الموصوفة من قبل (Leslie و Summerell، 2006; Ellis و آخرون، 2007).

3-2-2 أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستعملة في الدراسة

استعملت في هذه الدراسة أنواع مختلفة من الفطر *Trichoderma* spp. (*T. atroviride* و *T. longibrachaitum* و *T. asperellum* و *T. aspirelloides*) و التي تم تشخيصها جزيئيا في دراسات سابقة أجريت من قبل الاسدي (2020) و فالح (2020) في مختبر فايروسات النبات في قسم وقاية النبات/ كلية الزراعة/ جامعة كربلاء أما عزلة الفطر *T. harzianum* فقد تم عزلها من المبيد Trichozone . تم تنشيط جميع هذه الأنواع على وسط البطاطا دكستروز اكار(PDA) و حفظها على وسط البطاطا دكستروز اكار(PDA) المائل (Slant agar) و الكليسرول (Glycerol 60%) وفق طريقة العمل الموصوفة لاحقاً.

3-3 حفظ العزلات الفطرية قيد الدراسة

3-3-1 الحفظ في أنابيب اختبار حاوية على الوسط الزرعي (PDA) المائل (Agar slants)

1- حضر وسط البطاطا دكستروز اكر(PDA) الجاهز وفق طريقة العمل الموصوفة في الفقرة 3-1-3 و وزع في أنابيب اختبار حجم كل منها 10 مل و بمقدار خمسة مل/ أنبوبة، وعقم بجهاز المؤصدة في نفس الظروف و الوقت المذكورين سابقا. وضعت الأنابيب بشكل مائل و ترك الوسط ليتصلب ثم لقح كل منها بعزلة فطرية معينة و حضنت في درجة حرارة 25 ± 2 مْ لمدة ثلاثة أيام. حفظت جميع الأنابيب فيما بعد في الثلاجة بدرجة حرارة 4 مْ.

2-3-3 الحفظ بواسطة الكليسرول (Glycerol 60%)

بأستخدام الطريقة الموصوفة من قبل Paul و آخرون (2015)، تم حفظ العزلات الفطرية لفترة طويلة، و ذلك بنقل 4-6 أقراص (0.5 سم/ قرص) من كل عزلة فطرية بعمر سبعة أيام منماة على وسط البطاطا دكستروز اكر (PDA) إلى أنابيب اختبار كل منها يحتوي كل منها على 20 مل كليسرول (Glycerol 60%) مع المزج بهدوء. حفظت الأنابيب في الثلاجة (4 مْ) لحين الاستعمال مع التأكد بين فترة و اخرى من حيوية الفطريات المحفوظة و ذلك بأخذ واحد مل من كل أنبوبة لتلقيح طبق بتري حاوي على وسط البطاطا دكستروز اكر(PDA) و تحضينه في درجة حرارة 25 $\pm$ 2 مْ.

4-3 تحميل الفطريات المعزولة على بذور الدخن

لغرض تحميل الفطريات المعزولة في هذه الدراسة من جذور نباتات الباميا المصابة و كذلك فطريات المقاومة الاحيائية (*T. atroviride* و *T. longibrachaitum* و *T. asperellum* و *T. aspirelloides*) و *T. harzianum* أستعملت بذور الدخن المحلي (*Panicum miliacem*) و ذلك بعد غسلها جيدا لإزالة الأتربة و الشوائب عنها و تنقيعها لستة ساعات بالماء. بعد التخلص من الماء الزائد، وزعت بذور الدخن على دوارق زجاجية (500 مل/ دورق) و سدت فوهتها بالقطن الطبي و ورق الالمنيوم (Aluminum foil). عقمت الدوارق بجهاز المؤصدة بنفس الظروف المذكورة سابقاً مع إعادة التعقيم في اليوم التالي تحت بنفس الضغط و درجة الحرارة و الوقت.

لقح كل دورق بخمسة أقراص (0.5 سم/ قرص) أخذت من الوسط الزرعي (PDA) النامي عليه عزلات الفطر بعمر سبعة أيام. حضنت الدوارق بدرجة حرارة 25 $\pm$ 2 مْ لمدة 14 يوماً مع مراعاة رج الدوارق كل يومين أو ثلاث أيام لضمان توزيع النمو الفطري على جميع البذور(Dewan، 1989).

5-3 اختبار القدرة الامراضية للفطريات المعزولة

1-5-3 اختبار القدرة الامراضية للفطريات المعزولة ضد انبات بذور الباميا على وسط الاكار المائي (Water Agar)

اختبرت القدرة الامراضية للفطريات المعزولة في هذه الدراسة وفق الطريقة الموصوفة من قبل Bolkan و Butler (1974) بتلقيح مركز كل طبق من أطباق بتري حاوي على الاكار المائي (المحضر وفق الطريقة الموصوفة في فقرة 3-1-3-2 بقرص (0.5 سم/ قرص) مأخوذ من منتصف المستعمرة الفطرية و تحضينه في درجة حرارة 25 $\pm$ 2 مْ و لمدة ثلاثة أيام. بعدها زرعت بذور باميا (محلية، صنف بترة) معقمة سطحيا بواسطة هايبوكلوريت الصوديوم (NaClO 1%) و بشكل دائري و بواقع 10 بذور/ طبق.

نفذت معاملة مقارنة بتطبيق جميع الخطوات المذكورة اعلاه باستثناء عدم تلقيح الأطباق بأي من الفطريات المختبرة. حضنت جميع الأطباق في درجة حرارة 25 ± 2 مْ لحين انبات جميع البذور في معاملة المقارنة بعدها حسبت النسبة المئوية للإنبات وفق المعادلة الاتية:

$$\text{النسبة المئوية للإنبات} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{\text{العدد الكلي للبذور}} \times 100$$

3-5-2 اختبار القدرة الامراضية للعزلات الفطرية ضد انبات بذور الباميا في الاصص البلاستيكية

نفذت هذه التجربة في الظلة التابعة لكلية الزراعة/ جامعة كربلاء باستخدام تربة مزيجية و بيتموس (1:2) و تعقيمها بالمؤصدة بدرجة حرارة 121مْ و ضغط 15 باوند/ انج^2 لمدة 60 دقيقة لمرتين و بفترة فاصلة يوم واحد. أضيف لقاح الفطر المحمل على بذور الدخن (1%) إلى التربة و خلطت جيدا ثم وضعت في اصص بلاستيكية (ثلاثة كغم/ اصيص) و سقيت باحتراس مع تغطيتها بأكياس بولي اثلين مثقبة. كما تم تنفيذ معاملة مقارنة بإتباع نفس الخطوات السابقة باستثناء عدم تلويث التربة بأي عزلة فطرية.

بعد مرور ثلاثة أيام، زرعت جميع الاصص ببذور باميا (محلية، صنف بترة) (10 بذرة/ اصيص) معقمة سطحياً بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم (NaClO 1%) و سقيت جيداً بالماء مع مراعاة إعادة السقي كلما دعت الحاجة لذلك. بعد مرور 10 يوم من الزراعة، حسبت النسبة المئوية لإنبات البذور بإتباع نفس المعادلة المذكورة في الفقرة 3-5-1. بناءً على ما توصلت اليه نتائج هذه التجربة، فقد تم اختيار الفطر *Fusarium* spp. الاكثر ضراوة (عزلة رقم 5) و تشخيصها مظهرياً و جزيئياً لغرض استخدامها في التجارب اللاحقة.

3-6 تشخيص الفطر الاكثر ضراوة المعزولة في هذه الدراسة

3-6-1 التشخيص المظهري للفطر الاكثر إمراضية المعزولة في هذه الدراسة

شخصت عزلة الفطر (5) الاكثر ضراوة مظهرياً بالاعتماد على الصفات المظهرية التي ذكرت من قبل Leslie و Summerell (2006) و Ellis و آخرون (2007) مثل الغزل الفطري المقسم و شكل و لون و كثافة المستعمرة و شكل و حجم و ألوان الابواغ بأستخدام المجهر الظوئي.

3-6-2 التشخيص الجزيئي للفطر الاكثر ضراوة المعزول في هذه الدراسة

3-6-2-1 استخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين (DNA) من عزلة الفطر *Fusarium* sp. (5) المعزولة في هذه الدراسة

استخلص الحامض النووي (DNA) للفطر الأكثر إمراضية المعزول في هذه الدراسة باستخدام العدة (Cat. No: FAPGK100) المجهزة من قبل شركة فافورجين (Favorgen) تايوان - الصين، و بأتباع الخطوات المزودة من قبل الشركة المصنعة:

1- اخذ حوالي 50- 100 ملغم من نمو الفطر المراد تشخيصه و النامي على وسط البطاطا دكستروز أكار (P.D.A) بعمر 4 - 6 يوما بواسطة (Pipette) و وضع في أنبوبة اختبار (Eppendorf tube)، لغرض سحقها بواسطة مدقة بلاستيكية صغيرة (Micro pestle) بعد إضافة 200 مايكروليتر من المحلول الدارئ FATG، ثم حضنت لمدة خمس دقائق بدرجة حرارة الغرفة.

2- أضيف 200 مايكروليتر من المحلول الدارئ FABG إلى العينة، ثم رجت لمدة خمس دقائق باستخدام جهاز المازج (Vortex mixer) ، وحضنت لمدة 10 دقائق في درجة حرارة 70 مْ و باستخدام حمام مائي مع رج الأنبوبة كل ثلاث دقائق خلال مدة التحضين.

3- أضيف 200 مايكروليتر من كحول الايثانول 95% إلى العينة ثم رجت لمدة 10 ثواني.

4- نقل الخليط بعد ذلك إلى أنبوبة الفصل (FAPG Column) و إجريت عملية الطرد المركزي بسرعة 14000 دورة/ دقيقة لمدة خمس دقائق، بعد ذلك تم التخلص من الراشح و الاحتفاظ بانبوبة الفصل (FABG Column) الحاوية على الحامض النووي DNA و المرتبط بالغشاء الموجود داخل أنبوبة ال FAPG و التي نقلت إلى أنبوبة جمع جديدة (Collection tube).

5- أضيف 400 مايكروليتر من المحلول الدارئ W1 و اجريت عملية الطرد المركزي بسرعة 14000 دورة دقيقة لمدة 30 ثانية للتخلص من المحلول الراشح و الاحتفاظ بأنبوبة الفصل (FABG Column).

6- تم إرجاع أنبوبة الفصل (FABG Column) إلى أنبوبة الجمع و إضافة 600 مايكروليتر من محلول الغسل (Wash buffer) و إجراء عملية الطرد المركزي لمدة 30 ثانية للتخلص من المحلول الراشح مع إعادة عملية الطرد المركزي لمدة ثلاثة دقائق للتخلص من متبقيات محلول الغسل.

7- وضعت أنبوبة الفصل (FAPG Column) في أنبوبة اختبار جديدة (Eppendorf tube) و أضيف 100 مايكروليتر من المحلول Elution buffer إلى مركز الغشاء الحاوي على الحامض النووي (DNA) مع تركها بشكل عمودي لمدة ثلاث دقائق في درجة حرارة الغرفة. أجريت عملية الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة دقيقة لمدة دقيقة واحدة. تم قياس تركيز و نقاوة الحامض النووي (DNA) الناتج و حفظه في درجة حرارة - 20 مْ لحين الاستعمال.

2-2-6-3 تقدير تركيز و نقاوة مستخلص الحامض النووي (DNA)

تم معرفة تركيز الحامض النووي (DNA باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer) تحت طول موجي 260 nm و باستخدام المعادلة الاتية:

تركيز الحامض النووي(µg/ml) = قيمة الامتصاص الضوئي على طول موجي 260nm × 50 ×عامل التخفيف (Dilution factor)

كما تم معرفة نقاوة الحامض النووي (DNA) عن طريق تطبيق المعادلة الآتية و الموصوفة من قبل (Williams و آخرون، 1997) و المثبتة ادناه:

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

بعد ذلك تم الاحتفاظ بالحامض النووي المستخلص من عزلة الفطر *Fusarium* sp. في درجة حرارة -20 مْ لحين تشخيصة باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

3-2-6-3 استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

لغرض تشخيص الفطريات المعزولة في هذه الدراسة، اجري اختبار تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام العدة (Cat. No‹Maxime PCR PreMix (i-Taq). 25026) المجهزة من قبل شركة iNtRoN الكورية المنشأ. نفذ تفاعل البلمرة المتسلسل بحجم اجمالي 20 مايكروليتر و الحاوي على واحد مايكروليتر من كل البادئ الأمامي (ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG) و الخلفي (TS4: TCCTCCGCTTATTGAT ATGC) (White و آخرون، 1990) و واحد مايكروليتر من الحامض النووي المستخلص. وضعت جميع المكونات المذكورة أعلاه في الانبوبة المجهزة من قبل الشركة المصنعة و أكمل الحجم بالماء (Nuclease-Freewater) إلى 20 مايكروليتر.

تم مضاعفة الحامض النووي لعزلة الفطر باستخدام خطوات و ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) الاتية: عملية مسخ اولي (Initial denaturation) للحامض النووي (DNA) لمدة خمسة دقيقة في درجة حرارة 98 مْ متبوعة بـ 35 دورة مؤلفة من عملية مسخ نهائي (Final denaturation) لمدة 40 ثانية في درجة حرارة 94 مْ، ارتباط البوادئ (Primer annealing) لمدة 40 ثانية في درجة حرارة 55 مْ، و من ثم استطالة أولية (Initial elongation) لناتج الحامض النووي المضاعف (PCR-amplified product) لمدة دقيقة واحدة في درجة حرارة 72 مْ، و أخيراً إنهاء تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) بخطوة الاستطالة النهائية (Final elongation) في درجة حرارة 72 مْ (Zhang و آخرون، 2012).

4-2-6-3 الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز

حضرت طبقة هلام الاكاروز (Agarose gel) بعد اخذ واحد غم من مسحوق الاكاروز و إذابته في 100 مل من المحلول الدارئ 1×TBE (Tris boric acid EDTA buffer) و لحين تحول الخليط إلى محلول رائق بوضعة في Microwave لغرض الاذابة. أضيف ثلاثة مايكروليتر من صبغة الـ Ethidium bromide بعد انخفاض درجة حرارة المحلول إلى حوالي 45 مْ. بعدها جهز القالب (Agarose gel tray) الخاص بصب الاكاروز و الحاوي على المشط في إحدى نهاياته لعمل حفر داخل طبقة الجل، ثم صب الاكاروز المذاب و الحاوي على صبغة الـ Ethidium bromide و ترك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة. عند تصلب طبقة الأكاروز، رفع المشط بحذر و أعيد القالب إلى مكانه في جهاز الترحيل، ثم أضيف المحلول 1×TBE إلى حوض الترحيل (Electrophoresis tank) مغطياً طبقة الاكاروز بارتفاع حوالي 70 ملم تقريبا. أضيف 10 مايكروليتر من الحامض النووي المضاعف بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) إلى كل حفرة (Well) من حفر طبقة هلام الاكاروز المحضرة سابقا. كما أضيف خمسة مايكروليتر من سلم الحامض النووي (Molecular-weight size marker) إلى الحفرة الموجودة في الجانب الأيسر من العينات المضافة لغرض تحديد حجم الحامض النووي المضاعف. أوصلت أقطاب مجهز الطاقة (Electrophoresis Power supply) بالتيار الكهربائي و شغل على 150 ملي أمبير و لمدة ساعة واحدة و على عدة مراحل. بعد إكمال عملية ترحيل العينات، فحصت طبقة هلام الاكاروز الحاوية على نواتج الحامض النووي (PCR products) تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV transillumination) و أخذت صور لها.

3-2-6-5تحليل تسلسل قواعد النيتروجينية للحامض النووي (DNA) المضاعف من العزلة الفطرية

لغرض تشخيص الفطر المعزول، أرسل ناتج الحامض النووي (PCR product) المضاعف من العزلة الفطرية بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) مع البواديء (ITS1 و ITS4) إلى شركة Macrogen (كورية الجنوبية) لغرض تحديد التسلسل القواعد النيتروجينية (Nucleotide sequence) و بالاتجاهين الامامي و الخلفي لناتج الحامض النووي المضاعف. حلل تسلسل القواعد النيتروجينية باستخدام برنامجBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) للمقارنة مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI،National Center for Biotechnology Information) و العائدة لنفس الفطر المشخص عالمياً. بالاعتماد على تسلسل القواعد النيتروجينية للعزلة المشخصة، تم رسم شجرة التحليل الوراثي باستخدام برنامج MEGA-X (Tamura و آخرون، 2018).

3-7 اختبار القدرة التضادية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *F. culmorum* في الوسط الزرعي PDA

اختبرت القدرة التضادية لخمس أنواع من الفطر *Trichoderma* spp. (*T. atroviride* و *T. longibrachaitum* و *T. asperellum* و *T. aspirelloides* و *T. harzianum*) ضد الفطر الممرض *F. culmorum* باستخدام طريقة الزرع المزدوج (Dual Culture Technique). قسم طبق بتري (8.5 سم) إلى قسمين متساويين، لقح القسم الأول و بالقرب من حافة الطبق بقرص (0.5 سم) مأخوذ من حافة مستعمرة الفطر *Trichoderma* spp. بعمر سبعة أيام، في حين لقح القسم الثاني بنفس الطريقة بقرص من مستعمرة الفطر الممرض *F. culmorum* و بواقع ثلاث مكررات لكل معاملة. كما نفذت معاملة المقارنة بتلقيح أطباق بتري اخرى بالفطر الممرض فقط. حضنت جميع الأطباق بدرجة حرارة 25 ± 2 مْ لحين و صول نمو الفطر الممرض إلى حافة الطبق. بعد ذلك حسبت النسبة المئوية لكفاءة فطريات المقاومة في تثبيط نمو الفطر باعتماد معادلة Abbott (1925) المثبتة أدناه:

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{معدل نمو الفطر بالمقارنة} - \text{معدل نمو الفطر بالمعاملة}}{\text{معدل نمو الفطر بالمقارنة}} \times 100$$

8-3 اختبار القدرة التكاملية بين أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في مقاومة الفطر الممرض *F. culmorum* في الوسط الزرعي P D A

استخدمت أنواع الفطر *Trichoderma* spp. بشكل متداخل لغرض معرفة فيما إذا كان هنالك تضادية فيما بينها و بين الفطر *T. harzianum* أو لا و ذلك باستخدام طريقة الزرع المزدوج (Dual culture technique)، اذ قسم طبق بتري (8.5 سم) إلى قسمين متساويين و لقح كل قسم من كل طبق بنوع مختلف من أنواع الفطر *Trichoderma* spp. مع تنفيذ معاملة مقارنة بتلقيح القسم الأول من الطبق فقط بنوع من أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و ترك القسم الأخر بدون التلقيح بأي نوع . حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 ± 2 مْ و بعد وصول نمو الفطر في معاملة المقارنة إلى حافة الطبق، سجلت معدلات النمو القطري و منها حسبت النسبة المئوية للتثبيط وفق معادلة Abbott (1925) المذكورة سابقا.

9-3 اختبار القدرة التضادية بين أكثر من نوع من أنواع الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *F. culmorum* في الوسط الزراعي (P.D.A)

لغرض معرفة القدرة التضادية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. الخمسة ضد الفطر الممرض *F.culmorum* و حسب طريقة الزرع المزدوج (Dual culture technique) حيث تم تقسيم كل طبق بتري (8.5 سم) حاوي على وسط البطاطا دكستروز اكر (P.D.A) المعقم إلى قسمين متساويين. لقح القسم الأول لكل طبق بقرص (0.5 سم) مأخوذ من مستعمرة الفطر الممرض *F. culmorum* بعمر خمسة أيام. اما القسم الأخر فقد لقح بأكثر من قرص كل منها مأخوذ من نوع معين من الفطر *Trichodema* spp. (2 أو 3 أو 4 أو 5 أقراص/ طبق). نفذت معاملة المقارنة بتلقيح القسم الأول من الطبق بالفطر الممرض فقط مع ترك الجزء الثاني بدون تلقيح بأي فطر و بثلاثة مكررات لكل معاملة من المعاملات المذكورة اعلاه. حضنت جميع الأطباق بدرجة حرارة 25 ± 2 مْ و لحين وصول نمو الفطر الممرض إلى حافة الطبق. سجلت النتائج بأخذ معدل أقطار النمو الفطري و منها حسبت النسبة المئوية لتثبيط نمو الفطر الممرض بالاعتماد على معادلة Abbott (1925) المذكورة سابقا.

10-3 تأثير رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على نسبة إنبات بذور بعض النباتات و الوزن الجاف لبادراتها في أطباق بتري

1-10-3 تحضير رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp.

حضر الوسط الغذائي السائل (P.S.B،Potato Sucrose Broth) بنفس الطريقة المذكورة في الفقرة 3-1-3-3 و توزيعه على دوارق زجاجية (500 مل/ دورق) و بمعدل 200 مل/ دورق. بعد انتهاء مدة التعقيم و انخفاض درجة الحرارة، أضيف إلى كل منها المضاد الحيوي (Chloramphenicol)

بمعدل 50 ملغم/ لتر ثم لقح كل منها بثلاثة أقراص أخذت من الوسط الغذائي (PDA) المنمى عليه احد أنواع الفطر *Trichoderma* spp.. كما اتبعت نفس الطريقة بتنمية كل أنواع الفطر *Trichoderma* spp. الأربعة في دورق واحد مع ترك دورق بدون عملية تلقيح بأي فطر كمعاملة مقارنة. حضنت جميع الدوارق في درجة حرارة 25 $\pm$ 2 م^{o} و لمدة 21 يوماً مع مراعاة رج الدوارق كل 3-4 أيام. بعد انتهاء فترة التحضين، تم ترشيح المزارع الفطرية بأتباع الطريقة الموصوفة من قبل ديوان و كمال الدين (2009) و المتمثلة باستعملت قناني زجاجية مثقبة من الأسفل بوساطة مثقب كهربائي و مسدودة بسداد مطاطي لتسهيل دخول المحاقن الطبية و سحب الراشح منها و حسب الكمية المطلوبة دون سحب الغزل الفطري الذي يكون عادة على سطح السائل مما يسهل عملية الترشيح و الحصول على الراشح بأسرع وقت دون تلوث الراشح المتبقي في القناني الأصلية مع اجراء بعض التحوير و المتمثل بوضع انبوبة مطاطية في الدورق و تركه لمدة ثلاثة ايام و من ثم يتم سحب الراشح من خلال الانبوبة.

3-10-2 تأثير تراكيز مختلفة من رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على نسبة إنبات بذور بعض النباتات و الوزن الجاف لبادراتها في أطباق بتري

لمعرفة تأثير رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على بذور (الباميا و الذرة الصفراء و الفجل) بعض النباتات المحلية و كذلك الوزن الجاف لبادراتها، حضرت تراكيز مختلفة (20 % و 40 % و 60 % و 80 % و 100%) من رواشح الأنواع الفطرية المختلفة و المحضرة في الفقرة 3-10-1. عقمت البذور سطحيا بواسطة محلول هيبوكلوريت الصوديوم (1%NaClO) لمدة دقيقتين ثم غسلت ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم و جففت بواسطة ورق ترشيح معقم. حضرت أطباق بتري (8.5 سم/ طبق) بوضع في كل منها طبقة خفيفة من القطن الطبي المعقم ثم وضع فوقها ورقة ترشيح معقمة. وزع في كل طبق 10 بذور و بثلاث مكررات و أضيف إليها أحجام متساوية من كل تركيز و لحد الإشباع ثم حضنت بدرجة حرارة 25 $\pm$ 2 م^{o} مع مراعاة الحفاظ على رطوبة ورق الترشيح بإضافة أحجام متساوية من كل تركيز من التراكيز المذكورة اعلاه. بعد مرور 10 أيام من التحضين، حسبت نسبة إنبات البذور وفق المعادلة المذكورة في الفقرة 3-5-1. كما تم حساب الوزن الجاف للبادرات النامية بعد سبعة أيام من حساب نسبة الانبات بوضعها في أكياس ورقية و تجفيفها في الحاضنة لحين ثبوت الوزن الجاف لها.

3-11 تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و الفطر الممرض *F. clumorum* على فعالية نبات الباميا من انزيمات البيروكسيديز (Peroxidase) و الكاتاليز (Catalase)

3-11-1 تهيئة نباتات الباميا المعاملة بالفطر الممرض *F. clumorum* و أنواع الفطر *Trichoderma* spp.

أجريت هذه التجربة في البيت البلاستيكي التابع لقسم وقاية النبات/ كلية الزراعة/ جامعة كربلاء في وسط مكّون من تربة مزيجية و بيتموس (1:2) تم تعقيمها بالمؤصدة لمرتين و بفترة فاصلة يوم واحد و تحت نفس درجة الحرارة و الضغط و الوقت المذكورين سابقاً. أضيف لقاح الفطر *F. clumorum* و أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المنمى على بذور الدخن و بنسبة 1 % إلى التربة المعقمة و الموضوعة في كيس بلاستيكي لغرض خلطها جيداً قبل وضعها في اصص بلاستيكية (ثلاثة كغم/ اصيص). سقيت الاصص و تركت لمدة 48 ساعة، ثم زرعت بذور باميا محلية صنف بترة معقمة سطحياً و بواقع 10 بذرة/ اصيص وفق المعاملات الاتية و التي نفذ كل منها بواقع ثلاثة مكررات.

1. تربة غير ملوثة بفطر (مقارنة).
2. تربة ملوثة بالفطر الممرض فقط (مقارنة).
3. تربة ملوثة بالفطر الممرض مع خليط من فطريات المقاومة الحيوية *Trichoderma* spp.
4. تربة ملوثة بالفطر *T. atroviride*.
5. تربة ملوثة بالفطر *T. longibrachaitum*.
6. تربة ملوثة بالفطر *T. asperellum*.
7. تربة ملوثة بالفطر *T. aspirelloides*.
8. تربة ملوثة بخليط من أنواع الفطر *Trichoderma* spp. الاربعة.

تم تقدير الانزيمات بعد وصول النبات الى مرحلة التزهير.

3-11-2 تقدير فعالية انزيم البيروكسيديز (Peroxidase) و الكاتاليز (Catalase) في نباتات الباميا المعاملة بالفطر الممرض *F. culmorum* و أنواع الفطر *Trichoderma* spp.

3-11-2-1 تقدير فعالية انزيم البيروكسيديز (Peroxidase) في نباتات الباميا المعاملة بالفطر الممرض *F. clumorum* و أنواع الفطر *Trichoderma* spp.

تحضير المحاليل و الكواشف :

1- الواياكول 0.1%(Guaiacol): حضر بمزج 100 مايكروليتر من الصبغة مع خمسة مل من الايثانول (70%) ثم اكمل الحجم بالماء المقطر إلى 100 مل.

2- بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) 0.15%: حضر بأخذ 150 مايكروليتر و اكمل الحجم بالماء المقطر إلى 100 مل.

3- المحلول الفوسفاتي الدارئ (pH7): حضر بإذابة 1.36 غم من أحادي فوسفات البوتاسيوم (KH_2PO_4) بـ 100 مل من الماء المقطر.

طريقة العمل :

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل Pitotti و آخرون (1995) في قياس انزيم البروكسيديز(Proxidase, POD)، اذ جمعت عينة من الجزء العلوي من نباتات الباميا و اخذ منها 0.50 غم و سحقت جيدا تحت ظروف مبردة بمساعدة مدقة و هاون خزفي و بوجود المحلول الفوسفاتي الداريء (10 مل). رشح المزيج بواسطة ورق ترشيح و وضع في الثلاجة بدرجة حرارة 2°م لحين قياس الامتصاصية بواسطة جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) و على الطول الموجي 436 نانوميتر. تم معايرة الجهاز (Spectrophotometer) بمزج حجوم متساوية (1 مل) لكل من الكواياكول (0.1%Guaiacol) و بيروكسيد الهيدروجين (15% H_2O_2) و المحلول الفوسفاتي الدارئ ثم اضيف اليها سبعة مل من الماء المقطر و مزجها جيدا، ثم اخذ ثلاثة مل من المحلول الناتج و وضع في الكويب المخبري (Spectrophotometer cuvette) لغرض تصفير الجهاز. بعدها تم مزج 100 مايكروليتر من المستخلص المحضر اعلاه و المحفوظ في الثلاجة مع ثلاثة مل من مزيج من الكواياكول (0.1%Guaiacol) و بيروكسيد الهيدروجين (15% H_2O_2) و المحلول الفوسفاتي الدارئ و وضعها في الكويب المخبري (Cuvette) و اخذت لها القراءة تحت الطول الموجي 436 نانوميتر مع مراعاة تسجيل القراءة بعد ثبوت قراءة الجهاز. تم حساب فعالية الانزيم (POD) من خلال المعادلة التالية :

$$\text{الفعالية الانزيمية (وحدة . مل}^{-1}) = \text{الميل} \times \frac{\text{الحجم الكلي لخلية الجهاز}}{\text{حجم الانزيم} \times \text{طول المسار الضوئي} \times \text{ثابت النفوذية}} \times 1000$$

حيث أن:

طول المسار الضوئي لخلية جهاز المطياف = 1 سم

ثابت النفوذية المولارية للكَواياكَول = 6.4 ملي مولار$^{-1}$. سم^2 و لكن المطلوب هنا بوحدات المايكرومولار، لذلك تضرب المعادلة × 1000.

3-2-11-2 تقدير فعالية انزيم الكاتاليز Catalase (CAT)

لغرض تقدير فعالية انزيم الكاتاليز (Catalase CAT)، اعتمد الطريقة الموصوفة من قبل Aebi (1983) و ذلك بتحضير المحاليل الاتية:

1- محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ (Potassium phosphate buffer، pH7، 20Mm) و يتكون من:

- **محلول A:** حضر بإذابة 0.346 غم من فوسفات البوتاسيوم (K_2HPO_4) في حجم قليل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.
- **محلول B:** حضر بإذابة 0.270 غم من مادة فوسفات البوتاسيوم (KH_2PO_4) في حجم قليل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.

2- محلول بيروكسيد الهيدروجين (10mM H_2O_2): حضر بإذابة 1.030 مل من محلول بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 30% في حجم قليل من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ ثم اكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.

طريقة العمل:

1- اخذ واحد غم من عينات ورقية جمعت من الجزء العلوي من النبات و سحقت جيدا بمساعدة مدقة و هاون خزفي و بوجود 10 مل من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ و 0.3 غم من مادة PVP (Polyvinylpolypyrrolodone) و في ظروف مبردة (بوجود جريش الثلج). رشح المستخلص عبر قطعتين من قماش الململ و نبذ مركزيا بسرعة 10000 دورة/ دقيقة و لمدة 10 دقائق و بدرجة 4 ْم.

2- اخذ 40 مايكروليتر من المستخلص الانزيمي و اضيف اليها 2 مل من محلول بيروكسيد الهيدروجين (30%) و حضن لمدة دقيقة واحدة في ظروف المختبر. بعدها اخذت القراءة باستخدام جهاز المطياف الضوئي و على الطول الموجي 240 نانوميتر.

حسبت فعالية الانزيم باتباع المعادلة التالية :

$$\text{فعالية الكاتاليز (وحدة)} = \frac{\Delta bs / \text{زمن التفاعل} \times \text{حجم التفاعل}}{0.01} \times 2$$

حيث أن :

Δbs = الفرق بين الامتصاصية (الامتصاصية الاولى – الامتصاصية الثانية)

حجم التفاعل = 2.04 مل

0.01= ثابت

12-3 تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في هذه الدراسة على محتوى النبات من بعض الهرمونات النباتية

1-12-3 تهيئة نباتات الباميا المعاملة بالفطر الممرض *F. clumorum* و أنواع الفطر *Trichoderma* spp.

لغرض معرفة تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و الفطر الممرض *F. culmorum* على محتوى نبات الباميا من هرمون الابسسك اسد (ABA) و هرمون الجبرلين (GA_3)، نفذت تجربة في البيت البلاستيكي في كلية الزراعة/ جامعة كربلاء، وفق طريقة العمل المذكورة في الفقرة (3-11-1) و بنفس المعاملات. و بعد وصول النباتات إلى مرحلة التزهير، أخذ 2-3 ورقة من الاوراق القريبة من القمة النامية من كل مكرر ضمن المعاملة الواحدة لغرض قياس تراكيز الهرمونات النباتية.

2-12-3 تقدير الهرمونات

تقدير الهرمونات: حامض الجبرلين (Gibberellic acid) و حامض الابسيسك (Abscisic acid)

تحضير المحاليل:

تم مزج احجام من الميثانول و الكلوروفورم و هيدروكسيد الامونيوم و بنسب 5: 3: 12، على التوالي لغرض تحضير 100 مل من الخليط.

طريقة العمل:

اتبعت طريقة Ergon و آخرون (2002) في قياس محتوى النبات من حامض الجبرلين (Gibberellic acid) و حامض الابسيسك (Abscisic acid) و بأتباع الخطوات الاتية:

1- جمعت عينات ورقية من الجزء العلوي من النبات و في مرحلة التزهير لغرض تجفيفها و طحنها بواسطة مطحنة كهربائية.
2- وضع 0.05 غم من العينات الورقية المجففة و المطحونة سابقاً في جفنة خزفية و اضيف اليها ثلاثة مل من الخليط المحضر سابقا (الميثانول و الكلوروفورم و هيدروكسيد الامونيوم) مع السحق و الخلط الجيد و بمساعدة مدقة زجاجية.
3- رشح المزيج بواسطة قطعة من الشاش و وضع في انبوبة اختبار لإضافة 1.25 مل ماء مقطر و مزج جيدا لتتكون في النهاية طبقتين. فصلت الطبقة العلوية (Aqueous phase) للمزيج و اهملت الطبقة السفلية منها مع ضبط الاس الهيدروجيني لمحلول الطبقة العلوية ليصبح 2.5 و بواسطة هيدروكسيد الهيدروجين المركز (NaOH) و حامض الهيدروكلوريك المركز (HCl).
4- اضيف ثلاثة مل من خلات الاثيل (Ethyl acetate) إلى المزيج لغرض استخلاصه بعد مزجة بواسطة جهاز المازج (Vortex mixer).

5- استخلص المزيج و تم قراءة الامتصاصية (Absorbance value) بواسطة جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) لكل من حامض الابسيسك (ABA) و الجبرلين (GA_3) و على الأطوال الموجية 254 و 263، علي التوالي.

13-3 تأثير تراكيز مختلفة من المنغنيز المخلبي (MnEDTA) و الحديد المخلبي (FeEDTA) على نمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp.

نفذت هذه التجربة باستخدام تراكيز مختلفة (0.25 و 0.50 و 0.75 و 1.00 غم/ لتر) من الحديد المخلبي (FeEDTA) و المنغنيز المخلبي (MnEDTA) بإضافتها كلا على حدة إلى وسط البطاطا دكستروز اكر (PDA) المعقم و المضاف اليه المضاد الحيوي كلورمفينيكول (Chloramphenicol) (50 ملغم/ لتر). بعد صب و تصلب الوسط، لقح مركز كل طبق من اطباق بتري بقرص (0.5 سم) مأخوذ من نوع فطري و بثلاثة مكررات لكل نوع من أنواع الفطر *Trichoderma* spp.. كما نفذت معاملة مقارنة بتلقيح اطباق اخرى غير معاملة باي من العناصر المعدنية. حضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 25 $\pm$ 2 مْ و عند وصول عزلة الفطر في إحدى المعاملات إلى حافة الطبق، سجلت النتائج بحساب معدل أقطار النمو الشعاعي للفطريات النامية.

14-3 تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و الفطر الممرض *F. culmorum* على محتوى نبات الباميا من العناصر المعدنية: البوتاسيوم و النتروجين و الفسفور

1-14-3 هضم العينات النباتية

نفذت تجربة في البيت البلاستيكي في كلية الزراعة/ جامعة كربلاء بهدف معرفة تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و الفطر الممرض *F. culmorum* على محتوى نبات الباميا صنف بترة من بعض العناصر المعدنية (البوتاسيوم و النتروجين و الفسفور) و باتباع طريقة العمل الموصوفة من قبل Jones (1984). كانت العينات موزعة بحسب الفقرة (3-12-1) لغرض هضم و تحليل العينات، أخذت عينات ورقية من الجزء العلوي من كل نبات و في بداية التزهير ثم اخذ 0.2 غم من كل عينة و وضعت في بيكر حجم 100 مل. أضيف اربعة مل من حامض الكبريتيك المركز (H_2SO_4) و 2 مل من حامض البيروكلوريك ($HClO_4$) ثم خلطت جيدا و رشحت بواسطة ورق ترشيح. اوخذ الراشح و سخن بدرجة حرارة 50 مْ و لحين تغير لون الراشح من اللون الاسود إلى الرائق ثم وضع الراشح في عبوات بلاستيكية حجم كل منها 100 مل و لكل عينة على حدة. خفف الراشح بالماء المقطر (50 مل) ليصبح جاهزا لقياس محتوى العينات من العناصر المعدنية. تم تحليل جميع العناصر المذكورة اعلاه في مختبرات مديرية زراعة كربلاء/ محافظة كربلاء.

3-14-2 تحليل البوتاسيوم

استخدم جهاز فوتوميتر اللهب الضوئي (Photoelectric flame photometer) لحساب تركيز البوتاسيوم في العينات النباتية المهضومة المكون كل منها من 50 مل و الموضوعة في بيكر حجم 100 مل و بالاعتماد على المعادلة الاتية الموصوفة من قبل الصحاف (1989).

$$\text{النسبة المئوية للبوتاسيوم} = \frac{\text{س} \times \text{ت} \times 100}{\text{ص} \times 5 \times 1000000}$$

حيث:
س: تركيز العنصر في العينة.
ت: التخفيف الذي جرى على العينة.
ص: وزن العينة النباتية/ غم.

3-14-3 تحليل النتروجين

تم قياس النتروجين في النبات بأستخدام جهاز كلدال (Kjeldahl) بأخذ خمسة مل من العينة المهضومة سابقاً و اضيفت لها هيدروكسيد الصوديوم و حسب المعادلة الاتية الموصوفة من قبل الصحاف (1989).

$$\text{النسبة المئوية للنتروجين} = \frac{\text{س} \times \text{ص} \times \text{ع} \times \text{الوزن الذري للنتروجين} \times 100}{\text{أ} \times \text{ب} \times 1000}$$

حيث ان:
س = حجم الحامض المستهلك.
ع = عيارية الحامض المستخدم في عملية التسحيح.
ص = حجم العينة المهضومة.
أ = حجم العينة المخففة.
ب = وزن العينة النباتية.

3-14-4 تحليل الفسفور

تم قياس وجود الفسفور في النبات باستخدام جهاز الطيف الضوئي (Spectrophotometer) و على الطول موجي 420 نانومتر بعد اخذ خمسة مل من العينة المهضومة سابقاً و أضافة لها مولبيدات الأمونيوم و حامض الاسكوربك و حسب المعادلة الاتية الموصوفة من قبل الصحاف (1989).

$$\text{النسبة المئوية للفسفور} = \frac{\text{س} \times 100 \times 100 \times 50}{\text{ص} \times 5 \times 1000000}$$

حيث أن:
س: تركيز الفسفور في العينة النهائية (جزء في المليون) بعد استراجها من الخط البياني للمحاليل القياسية.
ص: وزن العينة النباتية (غم).

15-3 تأثير تراكيز مختلفة من المبيد الكيميائي Topsin M في نمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و الفطر الممرض *F. culmorum* في أطباق بتري

حضر وسط البطاطا دكستروز(PDA) المعقم في دوارق زجاجية حجم كل منها 500 مل بنفس الطريقة المذكورة في الفقرة 3-1-3-1. بعد انخفاض درجة الحرارة إلى قبيل مرحلة التصلب و اضافة المضاد الحيوي كلورامفينيكول (Chloramphenicol)، أضيف المبيد الكيميائي (Topsin M) بالتراكيز0.25 و 0.75 و 1.00 الموصى به من قبل الشركة و 1.25 مل/ لتر كلاً منها على انفراد مع مزجها جيدا مع الوسط الزرعي. بعد تصلب الوسط، لقح مركز كل طبق بقرص قطر (0.5 سم) مأخوذ من مستعمرة فطرية (*Trichoderma* spp. أو *F. culmorum*) بعمر خمسة أيام. كما نفذت معاملة مقارنة بإتباع كافة الخطوات المذكورة اعلاه ماعدا تنمية الأنواع الفطرية في أطباق بتري حاوية على نفس الوسط الغذائي الغير معامل بالمبيد الكيميائي. حضنت جميع الأطباق بدرجة حرارة 25 ± 2 مْ و سجلت النتائج بعد وصول نمو الفطر في معاملة المقارنة إلى حافة الطبق و ذلك بقياس معدل الأقطار المتعامدة لنمو الفطر من ظهر الطبق و التي منها حسبت النسبة المئوية لتثبيط نمو الأنواع الفطرية المختلفة و باستخدام معادلة Abbott (1925) المذكورة سابقاً.

16-3 تأثير المبيد الكيميائي Topsin M و أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في إنبات بذور و نمو بادرات الباميا و الوزن الجاف لها في الاصص البلاستيكية

نفذت هذه التجربة في البيت البلاستيكي التابع لكلية الزراعة جامعة كربلاء في تربة (2 تربة مزيجية: 1 بيتموس) و تعقيمها بالمؤصدة في نفس الوقت و ظروف التعقيم المذكورة سابقاً و لمرتين و بفترة فاصلة يوم واحد بينهما. أضيف لقاح الفطر الممرض *F.culmorum* و أنواع *Trichoderma* spp. المحملة على بذور الدخن (1%) إلى تربة موضوعة في كيس بلاستيكي لغرض خلطها جيدا قبل وضعها في الأصص البلاستيكية (3 كغم/ اصيص) و بحسب ترتيب المعاملات المثبتة لاحقاً. كما استخدم المبيد الكيميائي Topsin M بتركيز 0.25 غم/ لتر و الذي ثبت بعدم تأثيره على أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في هذه الدراسة. سقيت الاصص و تركت لمدة 48 ساعة، ثم زرعت ببذور باميا محلية صنف بترة معقمة سطحياً و بواقع 10 بذرة/ اصيص تلاها معاملة الاصص بالمعاملات الاتية و بواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة.

1- تربة غير ملوثة بالفطر(مقارنة).

2- تربة ملوثة بالفطر الممرض فقط (مقارنة).

3- *F. culmorum* + Topsin M.

4- أنواع الفطر *Trichoderma* spp. + *F. culmorum* .

5 – Topsin M + أنواع الفطر *Trichoderma* spp. + *F. culmorum*.

6- Topsin M + تربة غير ملوثة بالفطر *F. culmorum* .

7- أنواع *Trichoderma* spp. + تربة غير ملوثة بالفطر *F. culmorum* .

حسبت النسبة المئوية لإنبات البذور بعد مرور 10 يوم من الزراعة و حسب المعادلة الاتية :

$$\text{النسبة المئوية للإنبات} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{\text{العدد الكلي للبذور}} \times 100$$

كذلك حسبت النسبة المئوية لموت البادرات بعد مرور ثلاثة اسابيع من الزراعة حسب المعادلة الاتية:

$$\text{النسبة المئوية لموت البادرات} = \frac{\text{عدد البادرات الميته}}{\text{عدد البادرات النابتة}} \times 100$$

كما تم حساب الوزن الجاف للبادرات و للمجموعين الجذري و الخضري بعد قلع النباتات و غسل جذورها تحت ماء حنفية للتخلص من الأتربة العالقة بالجذور و وضعها في اكياس ورقية و تجفيفها في فرن كهربائي بدرجة حرارة 60 م° لحين ثبات الوزن الجاف لها.

17-3 تصنيع مبيد حيوي من أنواع الفطر *Trichoderma* spp.

1-17-3 تحديد الوسط الملائم لنمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp.

بهدف الحصول على أكثر وسط غذائي تخمري ملائم لتنمية أنواع الفطر *Trichoderma* spp.، اختبر عدد من الأوساط و المتمثلة بنبات الخباز (مجموع خضري) و أزولا و كوالح الذرة و سعف النخيل و الثيل (المجموع الخضري) و التبن. غسلت تلك النباتات جيدا لإزالة الأتربة العالقة بها و جففت بدرجة حرارة 60 مْ لحين الجفاف التام و ثبوت الوزن لها. طحنت تلك النباتات و كلاً على انفراد بمساعدة طاحونة كهربائية لغرض الحصول على مسحوق ناعم ثم خلط كل منها جيدا مع الحديد المخلبي (FeEDTA) بوزن 0.75 غم/ كغم و وزعت بأوزان متساوية 50 غم في قناني زجاجية و عقمت بواسطة جهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ و ضغط 15 باوند/ انج^2 و لمدة 20 دقيقة. بعد انتهاء التعقيم و انخفاض درجة الحرارة، لقحت كل قنينة حاوية على وسط معين بجميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp. بأخذ ثلاثة أقراص (0.5 سم/ قرص) من كل نوع بعمر سبعة أيام و منمى سابقاً على وسط البطاطا دكستروز اكر (P.D.A). حضنت جميع القناني في الحاضنة بدرجة حرارة 25 ± 2 مْ لمدة 14 يوماً اخذين بنظر الاعتبار رج القناني كل ثلاثة أيام لضمان توزيع نمو الفطر على وسط التنمية. بعد انتهاء مدة التحضين و قبل التحميل أنواع الفطر على مواد تحميل مختلفة، تم حساب الكثافة العددية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. و كلا على حدة و ذلك بعمل سلسلة من التخافيف للحصول على التخفيف 10^9. نقل واحد مل من التخفيف المذكور (10^9) إلى طبق بتري، ثم أضيف اليه الوسط الغذائي (P.D.A) المعقم و

المضاف اليه المضاد الحيوي (Chloramphenicol) مع تحريك الطبق بهدوء مع تنفذيذ ثلاثة مكررات لكل معاملة و لكل نوع من الوسط حضنت الاطباق في درجة حرارة 25± 2 مْ و لحين ظهور المستعمرات الفطرية و امكانية حسابها وفق المعادلة الموصوفة من قبل Clark (1965) المثبتة ادناه:

عدد الوحدات التكاثرية/ واحد غرام لقاح = معدل عدد المستعمرات × مقلوب التخفيف المستعمل

و استناداً على النتائج المتحققة في هذه التجربة، تم اختيار وسط مسحوق الخباز كأفضل وسط لتنمية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5).

2-17-3 تحضير لقاح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و اختيار مادة التحميل المناسبة

حضر لقاح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. بنقل قرصين من كل نوع إلى دورق زجاجي (سعة واحد لتر) معقم و حاوي على طبقة خفيفة من وسط البطاطا دكستروز اكر (P.D.A) المعقم، و حضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 25 ± 2 مْ لمدة ثلاثة أيام، بعد ذلك أضيف 100 مل من وسط البطاطا السائل (P.D.B) المعقم و الحاوي على المضاد الحيوي (Chloramphenicol) مع الرج بلطف. حضن الدورق في درجة الحرارة المذكورة أعلاه و لمدة 24 ساعة. في اليوم الثاني اكمل الحجم إلى 500 مل بإضافة وسط البطاطا السائل (P.D.B) المعقم، و حضن الدورق بنفس درجة الحرارة المذكورة أعلاه لفترة 14 يوماً، آخذين بنظر الاعتبار رج الوسط كل ثلاثة أيام خلال فترة التحضين. حسبت الكثافة العددية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. وفق طريقة العمل المذكورة في الفقرة 3-17-1 بعد انتهاء فترة التحضين و قبل الإضافة إلى وسط مسحوق الخباز المعقم و باعتماد التخفيف 10^9 أضيف العالق الفطري إلى مسحوق الخباز بنسبة 3:1، و حضنت بدرجة حرارة 25 ± 2 مْ لمدة 14 يوم مع مراعاة رج الوسط كل 2-3 أيام خلال فترة التحضين. بعدها طحن الوسط النامي عليه أنواع الفطر *Trichoderma* spp. بعد تجفيفه بدرجة حرارة 50 مْ و لحين ثبوت الوزن(الاسدي، 2020). كما حسبت الكثافة العددية للفطريات النامية بإتباع نفس الطريقة و التخفيف المذكورة سابقاً و قبل إضافتها إلى مواد التحميل.

3-17-3 تحميل لقاح الفطر *Trichoderma* spp. على بعض المواد الحاملة

لغرض الحصول على مادة تحميل مناسبة لأنواع الفطر *Trichoderma* spp.، حضر عدد من المواد الحاملة (الرمل و التالك و الكاؤلين و كبريتات الكالسيوم) بعد وضعها بأوزان متساوية في قناني زجاجية و تعقيمها بواسطة جهاز التعقيم البخاري بدرجة حرارة 121 مْ و ضغط 15 باوند/ انج^2 و لمدة 20 دقيقة. قبل إجراء عملية التحميل، خلط مسحوق الخباز المنمى عليه أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المختلفة جيداً مع محلول مكون من السكروز و الكليسرول (60%) (5:1) و بنسبة خلط 2:1، حيث خلط

20 غم من مسحوق الخباز منمى عليه أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و المخلوطة مع محلول مكّون من الكليسرول و السكروز إلى 40 غم من المادة الحاملة. بعدها تم تحميل الفطر المنمى على مسحوق الخباز على مواد التحميل بنسبة 3:2 (مسحوق الخباز النامي عليه الفطر : مادة التحميل) ثم جفف بدرجة حرارة 60 مْ الحين ثبوت الوزن. تمت عملية التعبئة باستخدام اكياس بلاستيكية و اكياس ورقية و عبوات بلاستيكية حاملاً كل منها معلومات متعلقة بأسم المادة الحاملة و تاريخ تنفيذ عملية التحميل و بثلاثة مكررات لكل مادة حاملة. تمت عملية الخزن في الثلاجة (4 مْ) و كذلك تحت ظروف المختبر مراعين تسجيل درجة الحرارة و الرطوبة باستخدام جهاز قياس الحرارة و الرطوبة (Thermohygrometer) خلال فترة الخزن. حسبت الكثافة العددية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. شهرياً وفق طريقة العمل المذكورة في الفقرة 3-17-1 و لحين انتهاء التجربة.

3-18 تصميم التجارب و تحليلها احصائياً

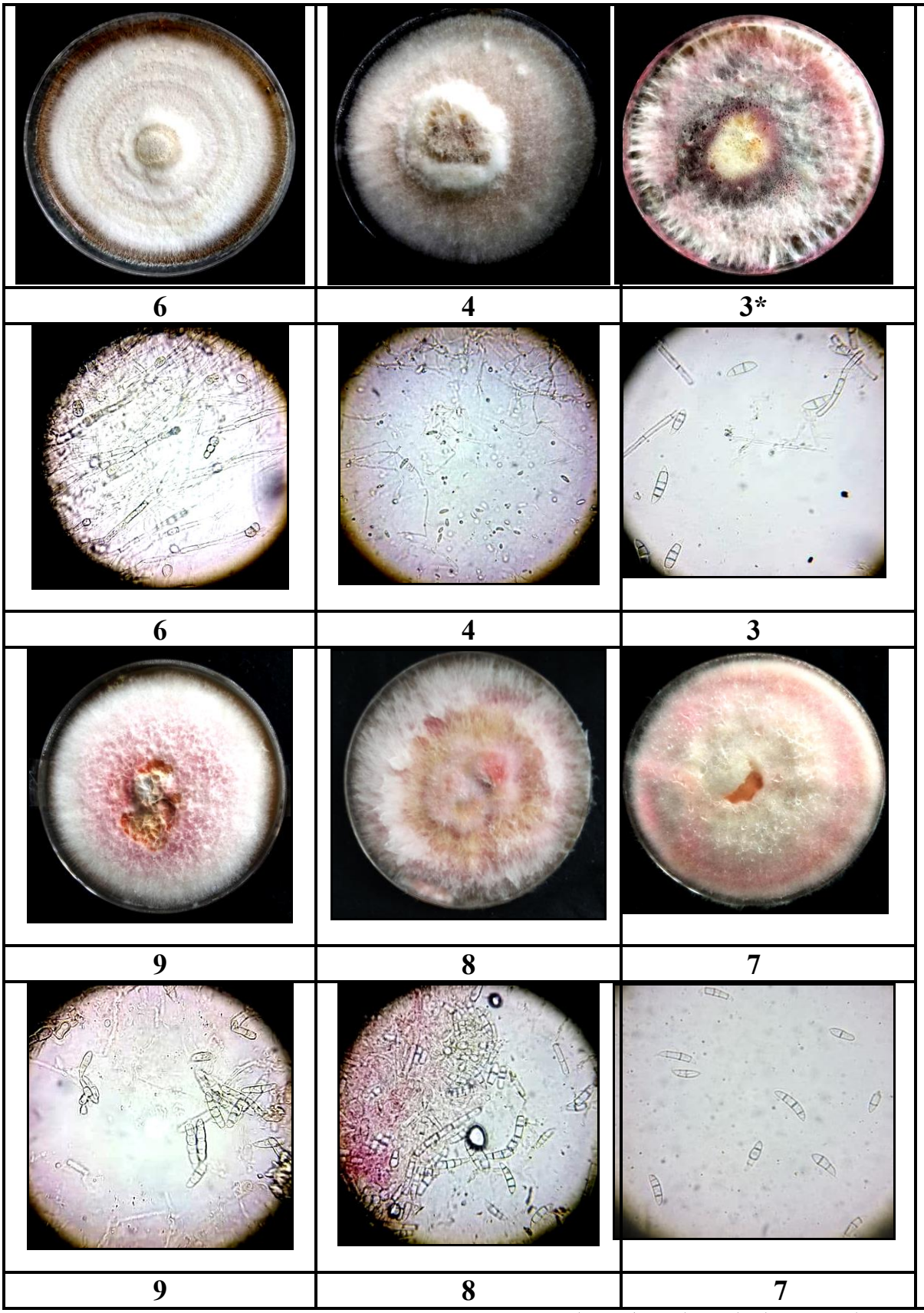
نفذت تجارب الدراسة بالاعتماد على التصميم العشوائي الكامل (Completely Randomized Design, CRD) للتجارب ذات العامل الواحد أو ذات العاملين، و مقارنة المتوسطات الحسابية باعتماد اقل فرق معنوي،(Least Significant Difference, L.S.D.) و تحت مستوى احتمال 0.05 (الراوي و خلف الله، 2000) و باستخدام البرنامج الاحصائي SAS.

4-النتائج والمناقشة (Results and Discussion)

4-1 العزل و التشخيص المظهري للفطريات الممرضة

أوضحت نتائج العزل من نباتات الباميا المصابة الحصول على 15 عزلة فطرية شخصت مبدئياً بالاعتماد على بعض الصفات المظهرية الموصوفة من قبل Leslie و Summerell (2006) و Ellis و آخرون (2007). أظهرت نتائج اختلاف مستعمرات العزلات النامية على وسط البطاطا دكستروز اكار (PDA) بأشكالها و ألوانها التي منها الأبيض و الوردي اضافة إلى امكانية بعض هذه العزلات على انتاج صبغات تنتشر في وسط التنمية بألوان مختلفة منها الأصفر و الوردي.

كما بينت نتائج التشخيص المظهري إن جميع الفطريات المعزولة تعود للجنس *Fusarium* spp. و التي تميزت بامتلاكها خيوط مقسمة (Septate mycelia) و ابواغ (Conidia) منها الهلالية الشكل (Macroconidia) و الصغيرة الكروية (Microconidia) و الابواغ الكلاميدية (Chlamydospores). الابواغ الهلالية (Macroconidia) تميزت بشكلها المنحني و المقسم و بنهايات اختلفت باختلاف عزلة الفطر منها المدببة أو المنحنية. اما الابواغ الصغيرة (Microconidia) فكانت مقسمة بحاجز الى قسمين و لم يلاحظ وجودها في بعض العزلات الفطرية. كما بين الفحص المجهري للعزلات الفطرية وجود الابواغ الكلاميدية (Chlamydospores) بوفرة مرتبة بشكل سلال أو مفردة و كان معظمها كروي و ذات جدران خشنة (شكل 3).



*تشير إلى رقم عزلة الفطر المعزول في الدراسة.

شكل (3) بعض الصفات المظهرية لبعض عزلات الفطر *Fusarium* spp. على وسط البطاطا دكستروز اكر (PDA); (3) يوضح السبورات و غزل فطري; (4) غزل فطري و الابواغ الصغيرة; (6) الابواغ الكلاميدية و غزل فطري; (7) ابوغ صغيرة; (8) غزل فطري و سبورات; (9) سبورات فطرية.

2-4 اختبار القدرة الامراضية (Pathogencity test)

1-2-4 اختبار القدرة الامراضية للفطريات المعزولة ضد انبات بذور الباميا على وسط الاكار المائي (Water Agar)

بينت نتائج اختبار القدرة الامراضية اختلاف الفطريات المعزولة (15عزلة) في قدرتها الامراضية في تأثيرها على انبات بذور الباميا و بنسب تراوحت بين 0.00%-72.60% قياساً بمعاملة المقارنة التي كانت نسبة الإنبات فيها 100%. وجد من بين تلك العزلات إن عزلة الفطر 5 كانت الأشد ضراوة من خلال منعها لإنبات البذور تماماً (0.00%)، تلتها العزلة 2 التي بلغت فيها نسبة الإنبات 23.33%، في حين كانت العزلة (1) الأقل من بين كل العزلات تأثيراً في خفض نسبة انبات البذور (72.60%). اما بقية نسب الانبات و بوجود العزلات الاخرى فقد تراوحت بين 30%-70% (جدول 3).

قد يعزى سبب تباين الفطريات المعزولة في المقدرة الامراضية إلى الاختلافات الوراثية و إلى تباين هذه العزلات في طبيعة المواد المنتجة منها مثل السموم و كذلك الانزيمات المحللة التي تساعد الفطر الممرض على اختراق العائل و إحداث الإصابة (Stepień و Chelkowski، 2010). أشارت دراسات عديدة إلى ان الأنواع الفطرية الممرضة تمتاز بقدرتها العالية على انتاج بعض الأنزيمات مثل Protease و Pectolytic و Cutinase و Cellulase و Pectinase التي تؤدي إلى اختلافها في طبيعة المركبات الأيضية السامة المنتجة و التي قد تعمل بشكل منفرد أو مشترك في منع انبات البذور (Lozovaya و آخرون، 2006; Bhattacharya و آخرون، 2013). كما ذكر Haggag و El-Gamal (2012) ان للفطر *Fusarium* spp. امكانية عالية على إفراز مواد ايضية مثبطة لإنبات البذور، فضلا عن إفرازه للإنزيمات التي تحلل مادة البكتين.

جدول (3) القدرة الامراضية للفطريات المعزولة في هذه الدراسة ضد انبات بذور الباميا على وسط الاكار المائي (Water Agar).

رقم العزلة	النسبة المئوية للإنبات	رقم العزلة	النسبة المئوية للإنبات
1	72.60*	**9**	60.00
2	23.33	**10**	70.00
3	60.00	**11**	50.00
4	30.00	**12**	46.66
5	0.00	**13**	63.66
6	50.00	**14**	40.00
7	30.00	**15**	53.30
8	46.66	**المقارنة**	100.00
$LSD_{0.05}$ = 12.157			

*كل رقم في الجدول يمثل معدل لثلاث مكررات.

4-2-2 اختبار القدرة الامراضية للعزلات الفطرية في إنبات بذور الباميا في الأصص البلاستيكية

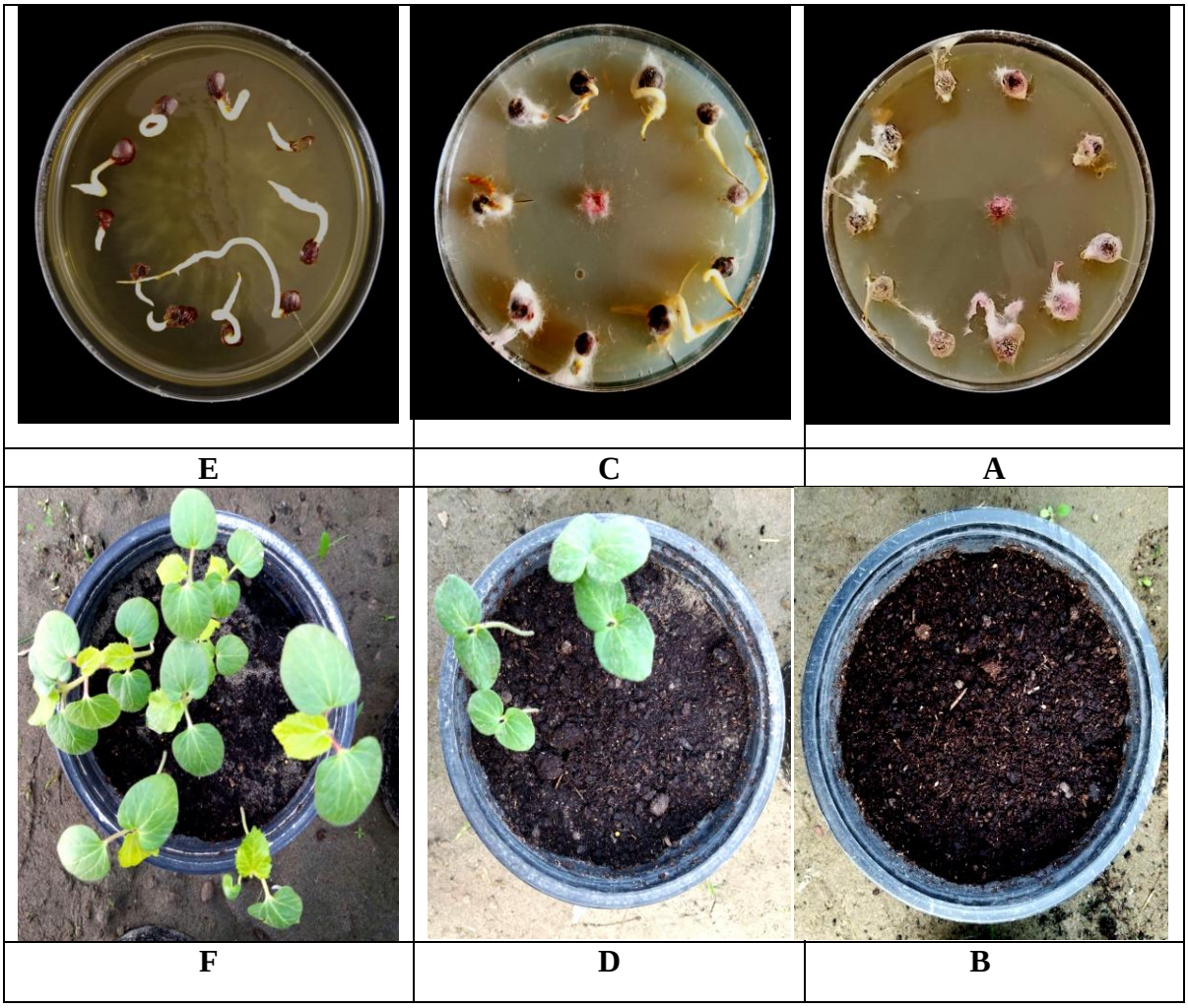
أظهرت النتائج المثبتة في جدول (4) أن للفطريات المعزولة تأثيرات واضحة في خفض نسبة إنبات البذور و بنسب تراوحت بين 0.00%-73.30% و بفارق معنوي عن نسبة الإنبات في معاملة المقارنة التي بلغت 100%. من بين جميع العزلات المختبرة، وجد أن عزلتي الفطر 5 و 2 كانت الأشد في خفض نسبة إنبات البذور و التي بلغت 0.00%، في حين كانت العزلة 1 من بين العزلات الأقل تأثيرا في خفض نسبة الإنبات و التي بلغت 73.30 % (جدول 4 و شكل 4).

ربما يعزى تفوق العزلة 2 و 5 على بقية الفطريات المعزولة في هذه الدراسة إلى طبيعة و تركيز المواد المنتجة و منها السموم و الانزيمات المحللة التي تعمل على قتل الأجنة و منعها من الانبات (Stack و آخرون، 2017). ذكر Perincherry و آخرون (2019) أن سبب الاختلاف في شدة الإصابة بالمسببات الفطرية يعود إلى كمية و نوع السموم و الانزيمات المنتجة من قبل تلك الفطريات التي تضعف أو تحطم اليات الدفاع في النبات. اتفقت هذه النتائج مع ما وجده Simay (1993) إلى ان بعض أنواع الفطر *Fusarium* spp. المستخدمة في دراسته أدت إلى اختزال نسب انبات بذور نبات الباقلاء (*Vicia faba*) و بنسب متفاوتة. استنادا لما توصلت اليه نتائج هذه التجربة، فقد اختيرت عزلة الفطر *Fusarium* sp. (5) الأشد امراضية لغرض تشخيصها مظهرياً و جزيئياً و لإكمال التجارب اللاحقة في هذه الدراسة.

جدول (4) اختبار القدرة الامراضية للفطريات المعزولة (15 عزلة) في هذه الدراسة ضد انبات بذور الباميا في الأصص البلاستيكية.

رقم العزلة	النسبة المئوية لإنبات البذور	رقم العزلة	النسبة المئوية لإنبات البذور
1	73.30*	**9**	10.00
2	0.00	**10**	16.66
3	20.00	**11**	20.00
4	13.33	**12**	30.00
5	0.00	**13**	50.30
6	46.30	**14**	46.60
7	16.66	**15**	49.50
8	48.60	**المقارنة**	100.00
LSD0.05 = 9.843			

*كل رقم في الجدول يمثل معدل لثلاث مكررات.

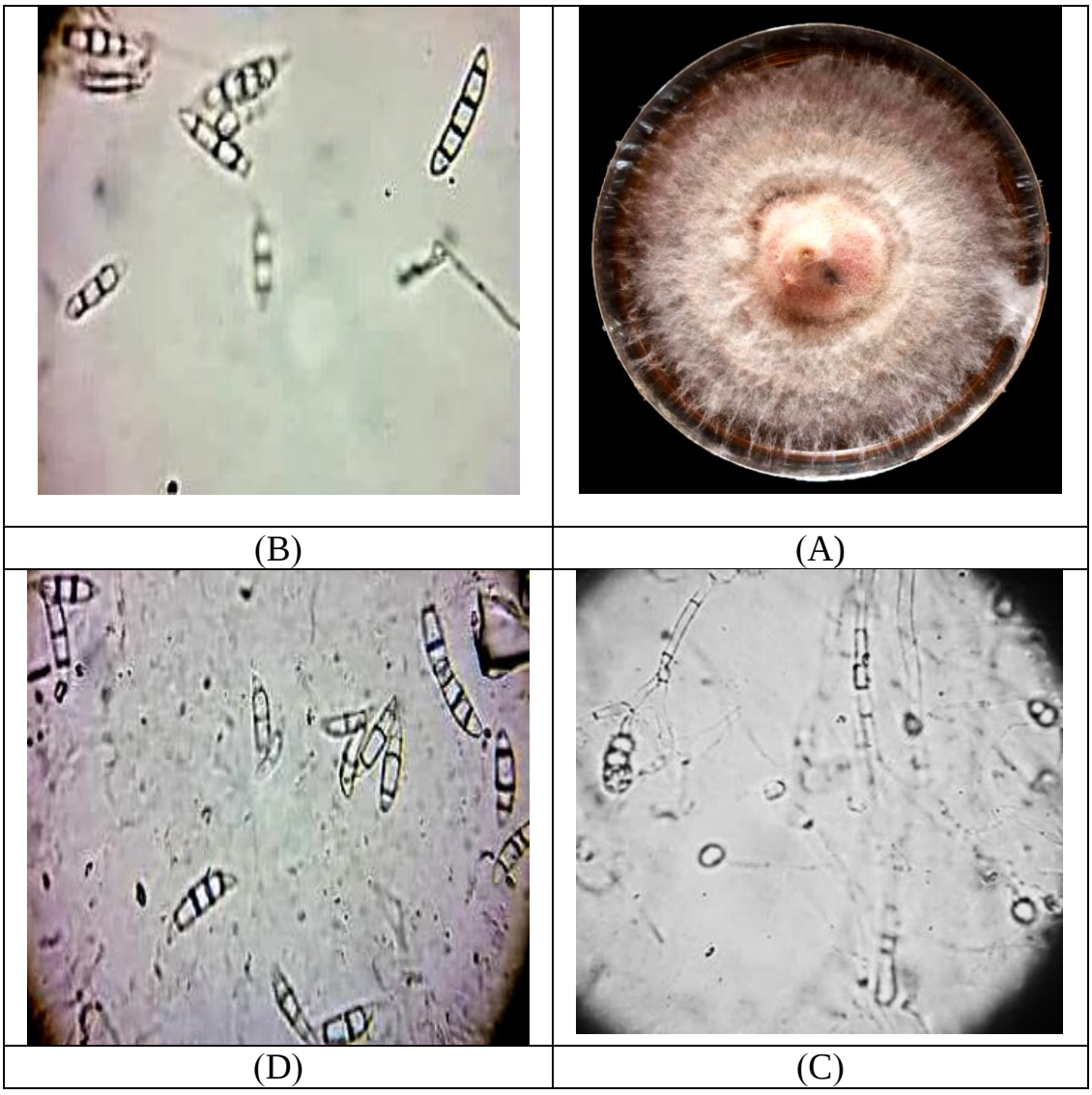


شكل(4) القدرة الامراضية للفطريات المعزولة ضد انبات بذور الباميا في أطباق بتري و الأصص البلاستيكية. (A) طبق ملوث بعزلة الفطر *Fusarium* sp. (5); (B) تربة ملوثة بعزلة الفطر *Fusarium* spp. (5); (C) طبق ملوث بعزلة الفطر (13); (D) تربة ملوثة بعزلة الفطر (13); (E) طبق غير ملوث بأي عزلة (مقارنة); (F) تربة غير ملوث بأي عزلة (مقارنة).

3-4 التشخيص المظهري لعزلة الفطر *Fusarium* spp. (5) الأكثر امراضية لبذور و بادرات الباميا

شخصت العزلة (5) الأكثر امراضية لبذور و بادرات الباميا مظهرياً و حسب المفتاح التصنيفي الموضوع من قبل Leslie و Summerell (2006); Ellis و آخرون (2007). تميزت عزلة الفطر (5) النامي على بيئة وسط البطاطا دكستروز اكر(PDA) بغزل فطري سريع النمو يتدرج في منذ بداية النمو من اللون الأبيض إلى البرتقالي الشاحب ثم إلى البني الفاتح متطوراً إلى اللون البني المحمر مع تقدم عمر مستعمرة الفطر. أوضح الفحص المجهري للفطر المعزول وجود خيوط مقسمة (Septate mycelia) مع غياب السبورات الصغيرة الكروية (Microconidia). اما السبورات الهلالية

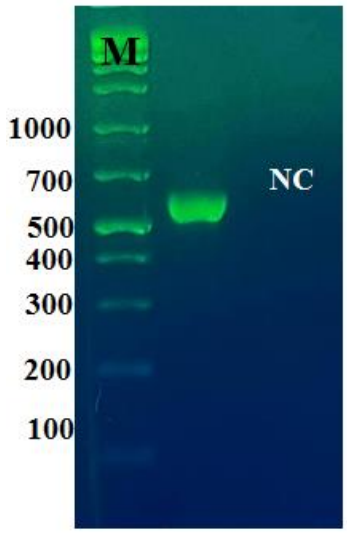
(Macroconidia) فهي فكانت متواجدة بغزارة و بصفات منها عريضة من المنتصف و بنهايات مدببة وذات مظهر خارجي منحني، في حين كان المظهر الداخلي مستقيم غالبا. اما الابواغ الكلاميدية (Chlamydospores) فقد لوحظت بوفرة و ذات أشكال كروية خشنة الجدران و مرتبة بشكل سلال، اتفقت هذه النتائج مع صفات الفطر المعزول في هذه الدراسة مع الصفات التصنيفية التي ذكرها Scherm و آخرون (2013) من حيث الصفات التي تم ذكرها.



شكل (5) عزلة الفطر (5) الاكثر امراضية و المعزولة في هذه الدراسة. (A) مستعمرة الفطر نامية على وسط البطاطا دكستروز اكر (PDA). (B و C و D) بعض الصفات المظهرية للفطر (Spetate mycelia و Macroconidia و Chlamydospores).

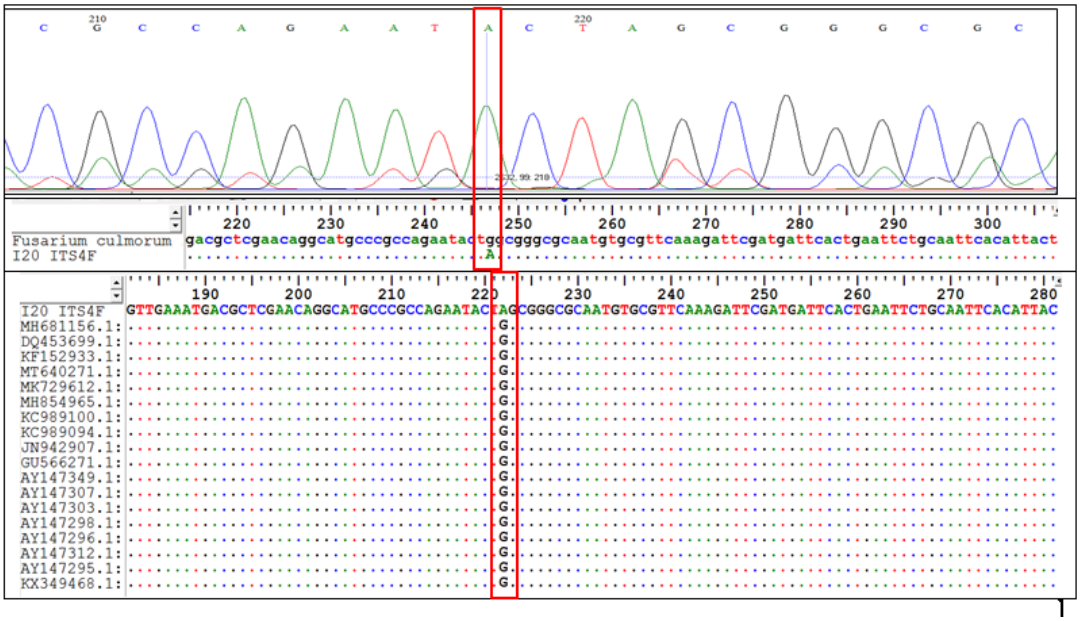
4-4 التشخيص الجزيئي لعزلة الفطر *Fusarium* spp. (5) الاكثر امراضية

أظهرت نتائج استخلاص الحامض النووي (DNA) من عزلة الفطر *Fusarium* spp. (5) و تعريضه إلى تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) امكانية مضاعفة ناتج من الحامض النووي (PCR-amplified product) و بحجم حوالي 550 زوج قاعدة نيتروجينية (Base pair)،bp و باستخدام البوادئ الأمامية (ITS1) و الخلفية (ITS4) (شكل 6).

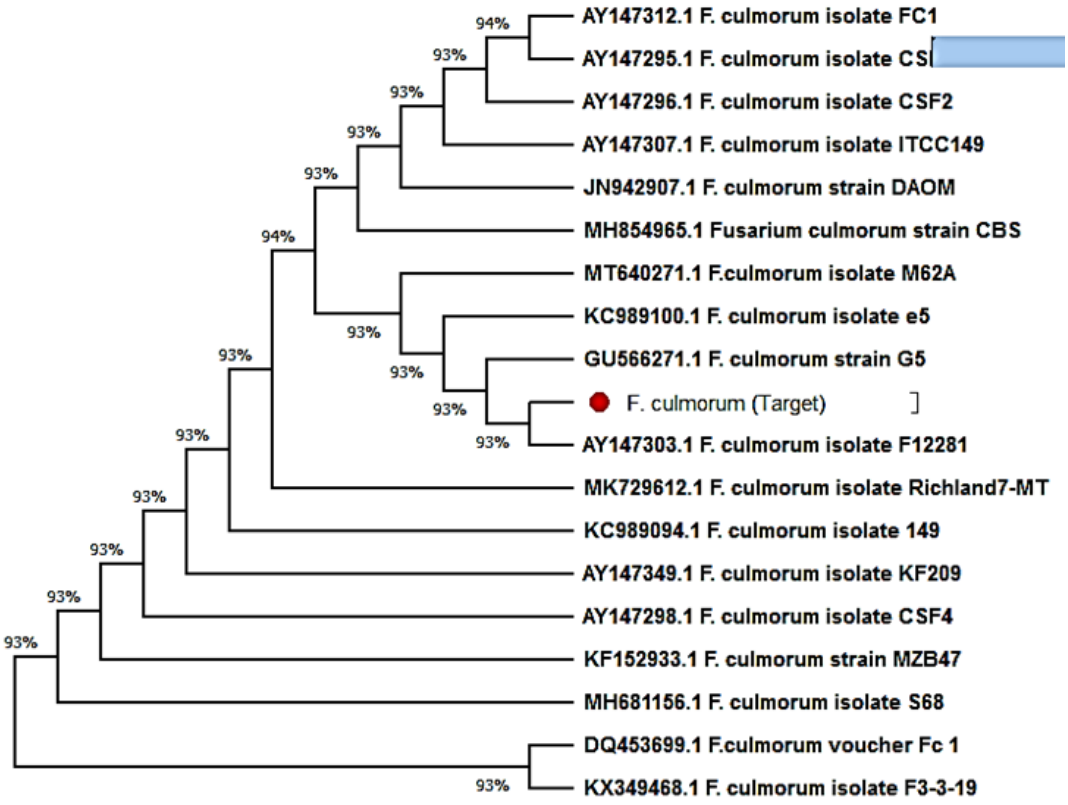


شكل (6) ناتج الترحيل الكهربائي للحامض النووي (DNA) المضاعف بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من عزلة الفطر *Fusarium* spp. (5) المعزولة في هذه الدراسة. **M** = سلم الحامض النووي (DNA Leader) بعدد أزواج القواعد النيتروجينية مثبتة على الجانب الأيسر من الشكل. **NC**: مقارنة سالبة (Negative control) تحتوي على كل مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR mixture) باستثناء الحامض النووي (DNA) المستخلص من الفطر المعزول.

أوضحت نتائج تحليل تسلسل القواعد النيتروجينية (Nucleotidesequenceanalysis) لناتج الحامض النووي (DNA) المضاعف من الفطر المعزول و باستخدام برنامج BLAST للمقارنة مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية (NCBI) بأن هذه العزلة تعود إلى الفطر *Fusarium culmorum*. وجد من خلال تحليل تسلسل القواعد النيتروجينية ان نسبة التشابه في تسلسلات القواعد النيتروجينية للمنطقة الجينية (ITS1)،5.8S rDNA and ITS4 للفطر المعزول في هذه الدراسة (*F. culmorum*) و العزلات الأخرى العائدة لنفس الفطر و المسجلة سابقا في المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية (NCBI) بلغت 93% و منها المعزولة من استراليا (AY147303) (شكل 7 و شكل 8).



شكل (7) التشابه و الاختلاف في تسلسلات القواعد النيتروجينية (Multiple neocleotide sequence alignments) لنتائج الحامض النووي (PCR-amplified product) المضاعفة من عزلة الفطر *F. culmorum* المعزولة في هذه الدراسة و العزلات الأخرى العائدة لنفس الفطر و المسجلة سابقاً في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).



شكل (8) شجرة التحليل الوراثي (Neighbor-Joining tree) تبين العلاقة الوراثية لعزلات الفطر *F. culmorum* المعزولة في هذه الدراسة و العزلات الأخرى المسجلة سابقاً في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI).

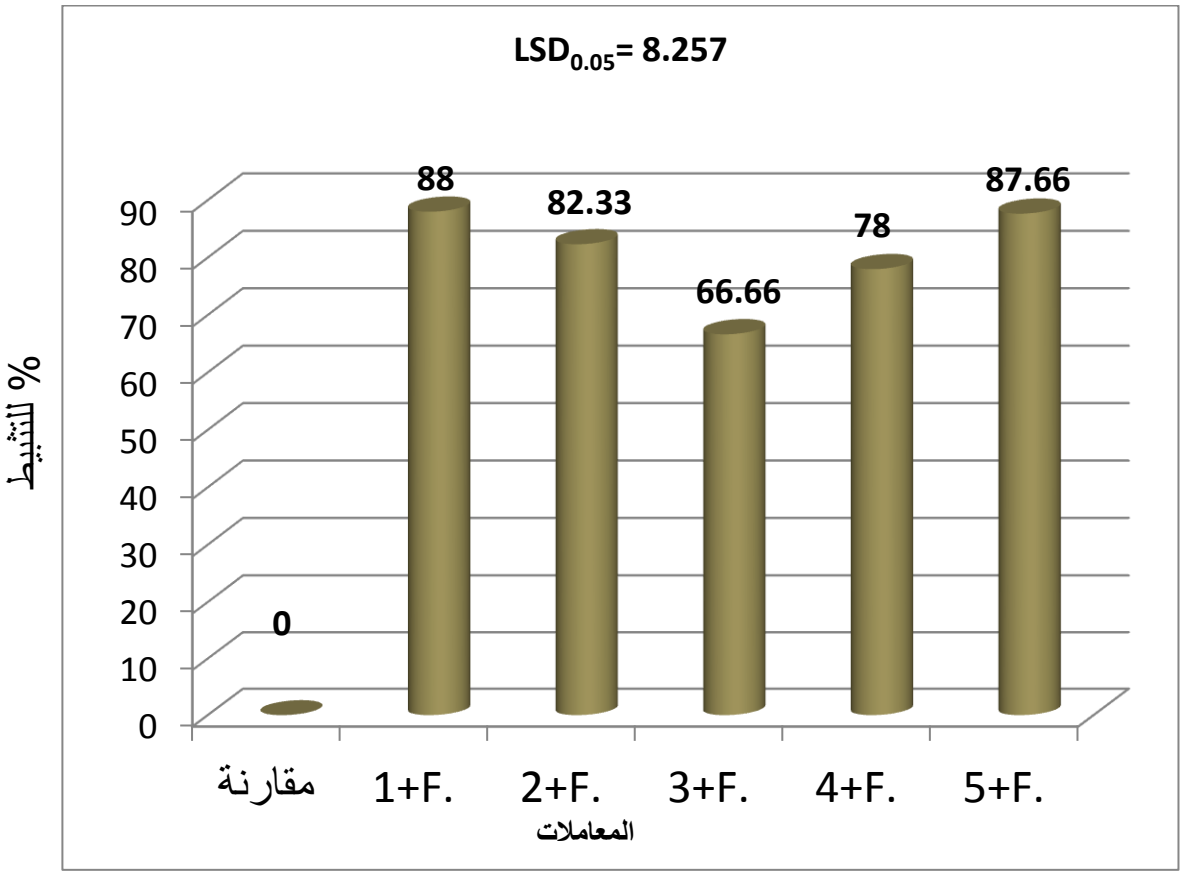
يستنتج من النتائج اعلاه ان عزلة الفطر *F. culmorum* المعزولة في هذه الدراسة كانت مختلفة وراثياً عن تلك المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية (NCBI).

أستخدمت تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) بشكل واسع في تشخيص العديد من الكائنات الحية المجهرية بما فيها الفطريات و البكتريا و الفايروسات و غيرها (Al-Abedy و آخرون، 2018). في هذه الدراسة استغلت المنطقة الجينية (ITS1, 5.8S rDNA and ITS4) في تشخيص الفطر *F. culmorum* و التي أيضاً استخدمت في دراسات سابقة في تشخيص العديد من أنواع الفطر *Fusarium* (Gomes-Silva و آخرون، 2017). أسهمت طريقة التشخيص الجزيئي بالاعتماد على الاختلافات الموجودة في تتابع الحامض النووي لمنطقة ال ITS (Internal transcribed spacer) كفاءته عالية في تشخيص العديد من الفطريات مثل *Fusarium* spp. و *Cladosporium* spp. و *Fusarium verticillioides* (Al-Fadhal و آخرون، 2018; Al-Sharmani و آخرون، 2019 ; Al-Abedy و آخرون، 2020). كما استخدمت هذه المنطقة في تشخيص أنواع اخرى عائدة لفطريات اخرى مثل الفطر *Rhizoctonia solani* و *Pythium* spp. و *Alternaria* spp. و غيرها (Al-Abedy و آخرون، 2018).

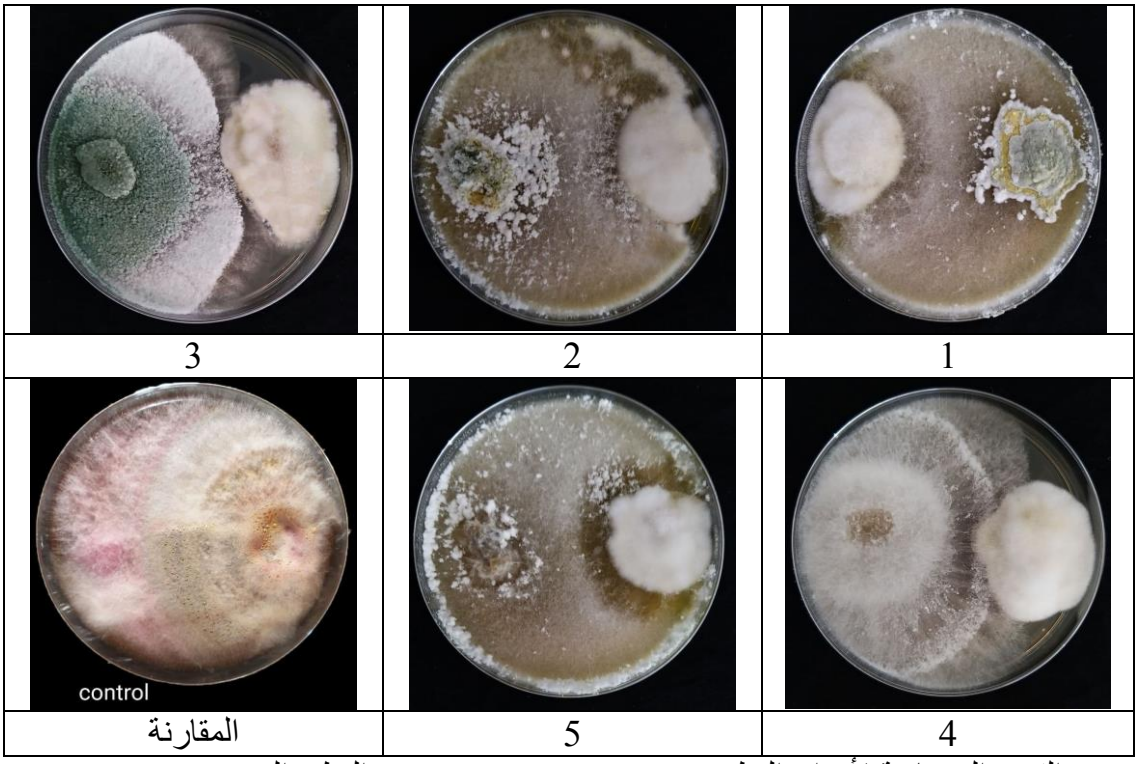
يعد التشخيص الدقيق للفطريات من الحاجات الملحة للوصول إلى الهدف المنشود في إيجاد طريقة أو طرائق فعالة في إدارة المرض (Yang و آخرون، 2007; Zhang و آخرون، 2012; Huang و آخرون، 2016). لجأ الكثير من الباحثين إلى التشخيص الجزيئي للفطريات لدقته في التشخيص إلى مستوى النوع أو السلالة و لإبعاد مشاكل التشخيص المعتمد على الصفات المظهرية (Morphological characteristics) التي منها حاجة القائم بعملية التشخيص إلى خبرة عالية و وقت و جهد كبيرين، اضافة إلى تأثر بعض الفطريات ببعض العوامل البيئية كطبيعة وسط التنمية و كذلك الإضاءة و الرطوبة و الحرارة التي تؤثر على أشكال و أحجام و ألوان السبورات. وجد بعض الباحثين ان هناك خطأ في التصنيف المظهري للعديد من الفطريات المشخصة في دراسات سابقة و منها أنواع تابعة للفطر *Fusarium* spp. مثل *F. verticillioides* و *Fuarium subglutinans* عند إعادة تشخيصها مرة اخرى باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) (Chandra و آخرون، 2008; Hsuan و آخرون، 2011; Arif و آخرون، 2012; Alhussaini و آخرون، 2016).

5-4 اختبار القدرة التضادية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *F. culmorum* في الوسط الزرعي PDA

أثبتت النتائج كفاءة جميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (1 و 2 و 3 و 4 و 5) في تثبيط عزلات الفطر الممرض *F. culmorum* و بفارق معنوي عن معاملة المقارنة (الفطر الممرض بمفردة) (شكل9). كما أظهرالفطر *Trichoderma* spp. نوع (1) قدرة عالية في تثبيط الفطر الممرض و بنسبة بلغت 88% و التي لم تختلف معنويا عن أنواع الفطر 2 و 5 التي أعطت نسب تثبيط وصلت إلى 82.33% و 87.66%، على التوالي. بينما وجد ان اقل نسبة تثبيط للفطر الممرض (66.66%) كانت بوجود *Trichoderma* نوع (3).



شكل (9) القدرة التضادية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *F. clumorum* على الوسط الزرعي PDA. (1) الفطر *T. harzianum*; (2) الفطر *T. atroviride*; (3) الفطر *T. longibrachaitum*; (4) الفطر *T. asperellum*; (5) الفطر *T. aspirelloides*; (F.) *F. culmorum*.

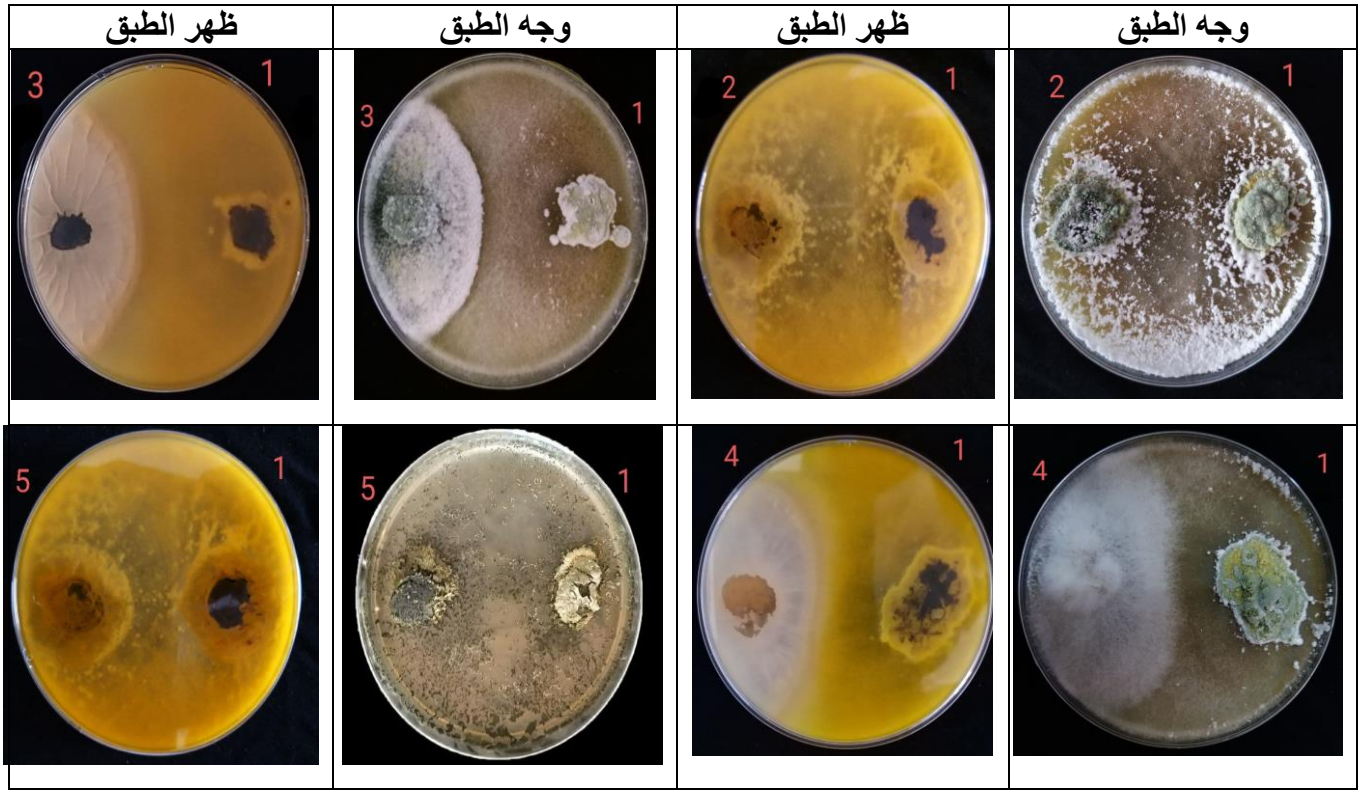


1	2	3
4	5	المقارنة

شكل (10) القدرة التضادية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *F. clumorum* على الوسط الزرعي PDA. (1) الفطر *T. harzianum*; (2) الفطر *T. atroviride*; (3) الفطر *T. longibrachaitum*; (4) الفطر *T. asperellum*; (5) الفطر *T. aspirelloides*

6-4 اختبار القدرة التكاملية بين أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في الدراسة

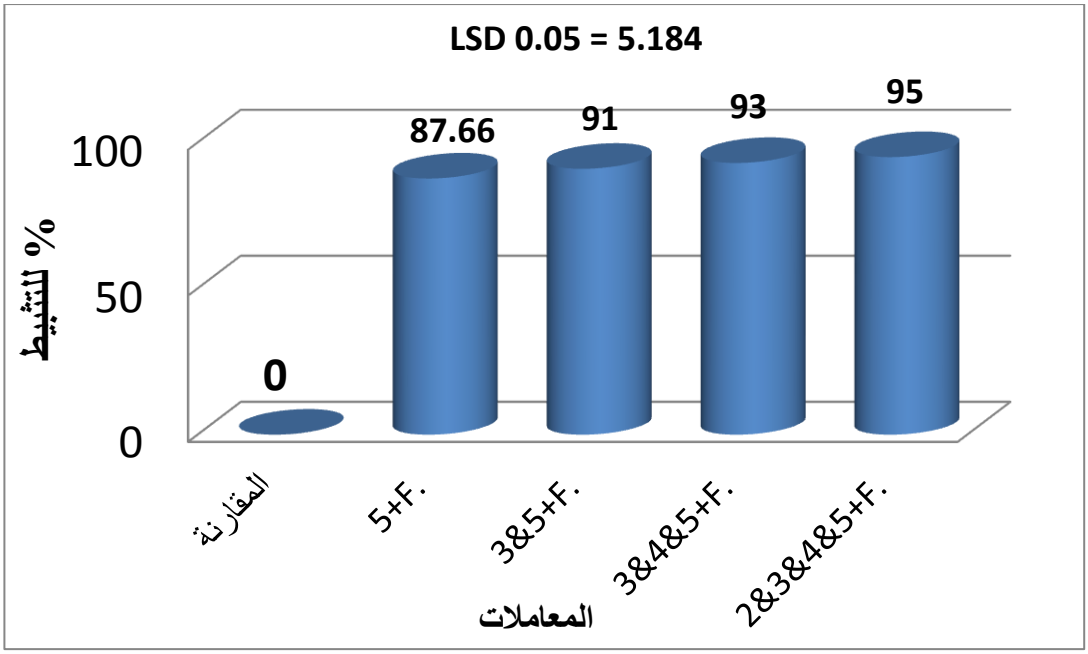
أظهر النتائج الموضحة في الشكل (11) أن هناك قدرة تضادية بين الفطر *Trichoderma* spp. نوع (1) و أنواع الفطر (3) و (4)، في حين لم تظهر هذه العزلة قدرة تضادية مع أنواع الفطر (2) و (5). مما يشير إلى امكانية استخدام نوع الفطر *Trichoderma* (1) مع أنواع الفطر *Trichoderma* (2) و (5) في الإضافة معا في نفس بيئة النبات لمقاومة العديد من مسببات أمراض النبات و كذلك تشجيع نمو النبات و انعكاس ذلك ايجابيا على انتاج النبات كماً و نوعاً. اما بخصوص القدرة التضادية بين أنواع الفطر *Trichoderma* spp. 2 و 3 و 4 و 5، فقد اختبرت سابقاً من قبل الاسدي (2020) و فالح (2020) الذين اثبتوا عدم وجود قدرة تثبيطية بين هذه الأنواع. بناءً على نتائج هذه التجربة، فقد اختيرت الأنواع الفطرية 2 و 3 و 4 و 5 و استبعاد النوع *T. harzianum* (1) لغرض إكمال التجارب اللاحقة و منها تصنيع المبيد الحيوي.



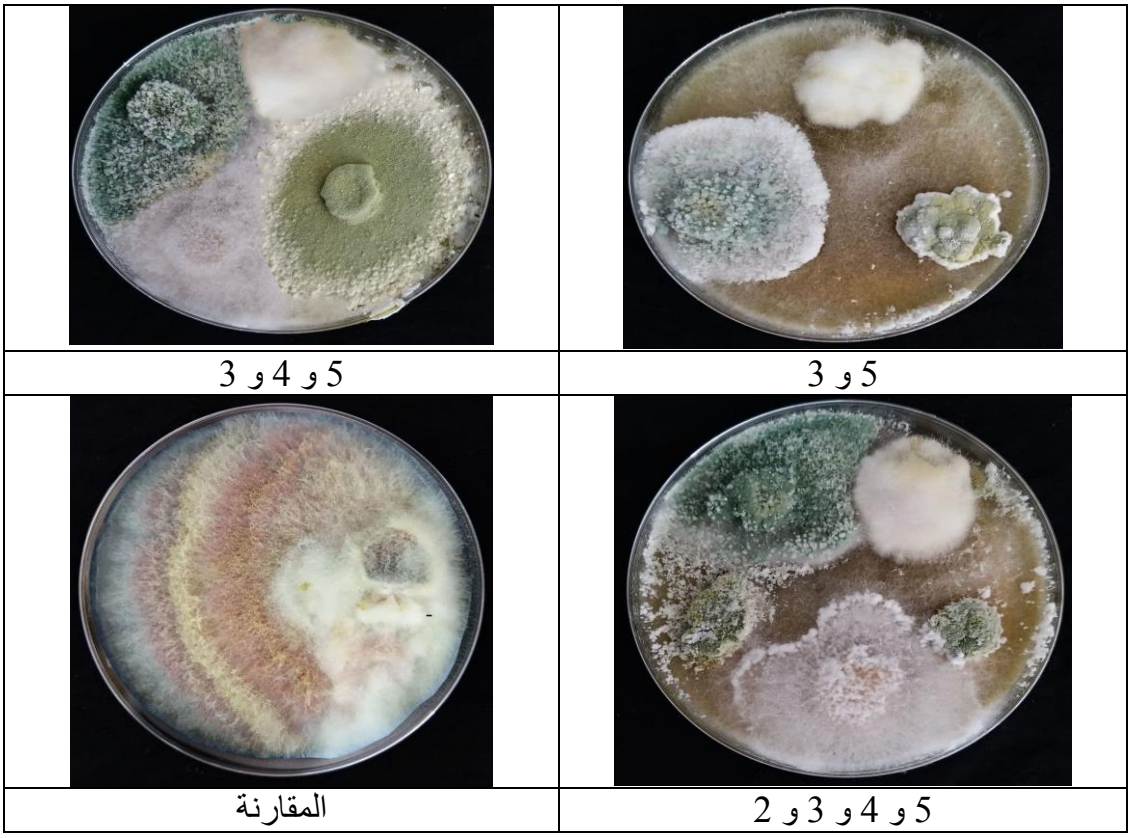
شكل(11) القدرة التداخل بين أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على الوسط الزرعي (PDA). (1) *T. harzianum*; (2) الفطـر *T. atroviride*; (3) الفطـر *T. longibrachaitum*; (4) الفطـر *T. asperellum*; (5) الفطر *T. aspirelloides*.

7-4 اختبار القدرة التضادية لأكثر من نوع من الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *F. culmorum* في الوسط الزرعي (PDA)

أوضحت النتائج امكانية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على تثبيط نمو الفطر الممرض *F. culmorum* عند استخدامها بشكل مفرد و ازدادت نسب التثبيط للفطر الممرض عند استخدام أكثر من نوع من أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في نفس الوسط الزرعي (PDA) مقارنة بمعاملة الفطر الممرض بمفرده. لوحظ ان أعلى نسبة تثبيط لنمو الفطر الممرض كانت عند وجود جميع أنواع فطر المقاومة الإحيائية (2 و 3 و 4 و 5) شكل (12) مع الفطر الممرض في نفس طبق التنمية حيث بلغت 95% و التي لم تختلف معنوياً عن المعاملات الحاوية على أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (3 و 4 و 5) أو (3 و 5) و التي ثبطت الفطر الممرض بنسب بلغت 93% و 91%، على التوالي (شكل 12 و 13).



شكل(12) تـأثير الفعـل المشـترك لأكثـر مـن نـوع مـن أنـواع الفطـر *Trichoderma* spp. ضـد الفطـر الممرض *F. culmorum* ; (2) *T. atroviride* ;(3) *T. longibrachaitum* ;(4) *T. aserellum* ;(5) *T. asperelloides*



شكل (13) القدرة التضادية للتداخل بين أكثر من نوع من أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) ضـد الفطـر الممـرض *F. culomrum* فـي طبـق بتـري. (2) *T. atroviride* ;(3) *T. longibrachaitum* (4) ; *T. aserellum* (5) ; *T. asperelloides*.

8-4 تأثير تراكيز مختلفة من رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على انبات بذور بعض الأنواع النباتية (الباميا و الذرة و الفجل) و الوزن الجاف لبادراتها في أطباق بتري

بينت النتائج أن لإضافة رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. تأثيرا ايجابياً في زيادة النسب المئوية لإنبات بذور نبات الباميا و الذرة الصفراء و الفجل و كذلك الوزن الجاف لبادراتها (الاشكال 14 و 15). لوحظ ان هناك زيادة تدريجية في نسب انبات بذور الباميا مع زيادة تركيز راشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و التي كان أعلاها التركيز 100% الذي وصلت فيه نسبة انبات البذور إلى 100% قياساً بمعاملة المقارنة التي بلغت فيها نسبة الانبات 83.33%. كما كان لإضافة الراشح دوراً واضحاً في زيادة الوزن الجاف لبادرات الباميا و التي تدرجت بأوزانها مع زيادة التركيز المستخدم و التي كان أعلاها (0.25 غم/ بادرة) للبادرات المعاملة بتركيز الراشح 100% (شكل 16).

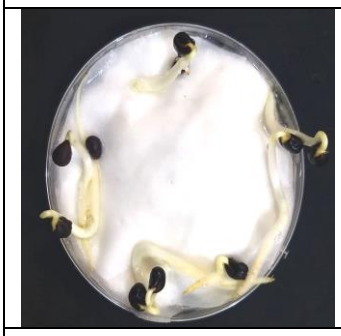
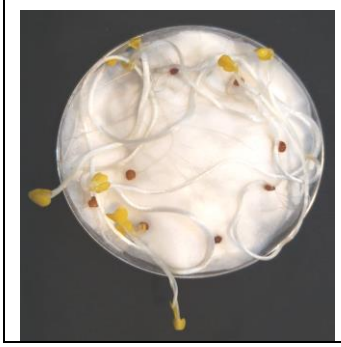
وجد أيضاً ان أعلى نسبة انبات لبذور نبات الذرة كانت عند المعاملة بتركيز الراشح 100% و الذي حقق نسبة انبات بلغت 100% (الاشكال 14 و 15). كما كان لتراكيز الراشح الاقل (20 و 40 و 60 و 80%) تأثيراً واضحاً في زيادة نسب الانبات بين (93.33% و 96.66 % ، على التوالي) و بفارق معنوي عن نسبة الانبات في معاملة المقارنة التي بلغت 80% شكل (10). تشجيع انبات البذور رافقه زيادة في نمو البادرات و الوزن الجاف لها و الذي تدرج بالزيادة مع زيادة تركيز الراشح المستخدم و الذي بلغ اعلاه (0.03غم/ بادرة)عند التركيز 100%، في حين بلغت الأوزان الجافة 0.02 و 0.024 و0.026 و 0.027 غم/ بادرة للبادرات المعاملة بتراكيز الرواشح 20% و 40% و 60% و 80%، على التوالي (شكل 16).

أما بالنسبة لمعاملة بذور و بادرات الفجل برواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp.، فقد وجد أن لزيادة تركيز الراشح تأثيراً محفزاً لانبات البذور و التي لوحظ اعلاها (100%) عند المعاملة بتراكيز الراشح 100% و لم تختلف هذه المعاملة معنوياً عن نسب الانبات التي اظهرتها المعاملات الاخرى (20% و 40% و 60%)، مع اختلاف جميع المعاملات الانفة الذكر معنوياً عن معاملة المقارنة التي اعطت اقل نسبة انبات بلغت 76.66% (الاشكال 14 و 15). كما أثبتت النتائج أن أعلى معدل للوزن الجاف (0.015 غم/ بادرة) سجل عند المعاملة براشح الأنواع الفطرية و بالتركيز 100%، تلتها المعاملة بتركيز الراشح 80% التي أنتجت بادراتها وزناً جافاً بلغ 0.012 غم/ بادرة و التي اختلفت معنوياً عن الوزن الجاف للبادرات غير المعاملة (المقارنة) بأي تركيز من رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. التي أعطت 0.002 غم/ بادرة (شكل16).

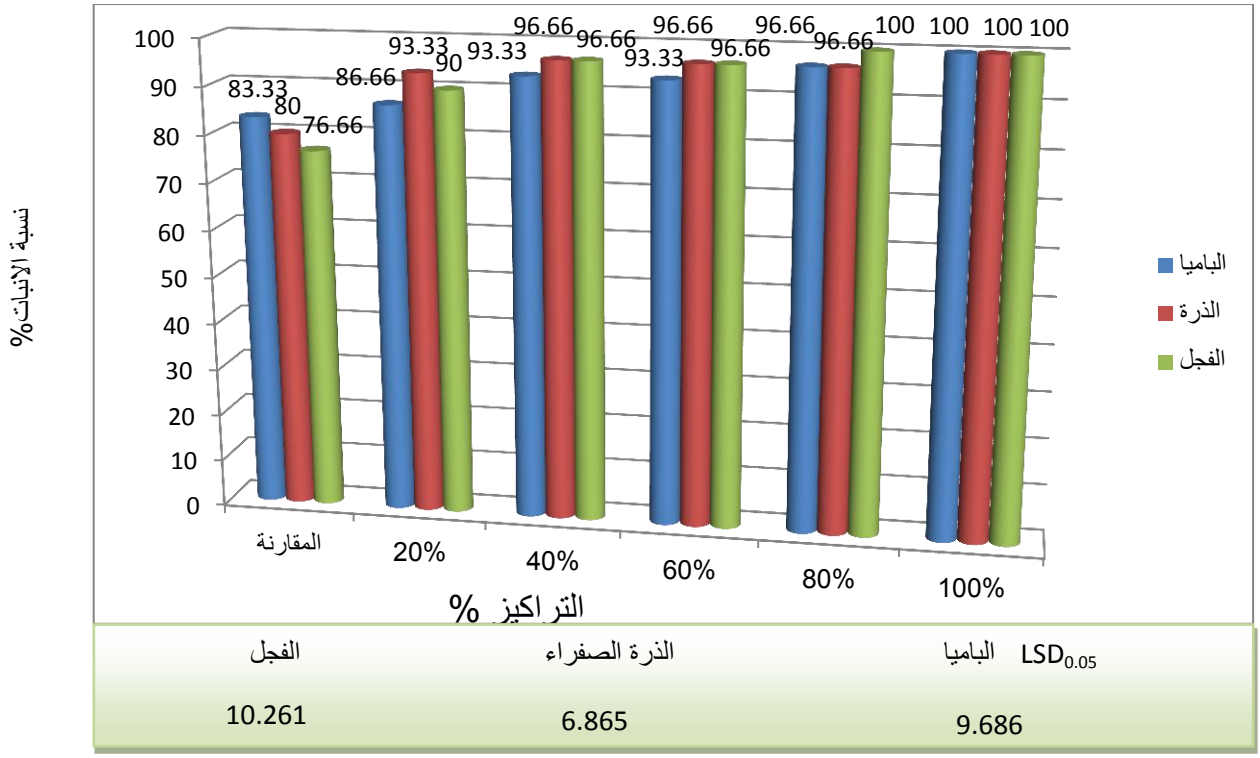
أثبتت نتائج هذه التجربة ان لرواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. تأثيراً واضحاً في زيادة نسب انبات بذور الباميا و الذرة و الفجل و كذلك الأوزان الجافة لها و خصوصا عند زيادة تركيز الراشح المضاف. وجد Dewan و آخرون (1994) و Harman (2000) أن لأنواع الفطر *Trichoderma*

.spp القابلية على إفراز بعض الانزيمات و منها انزيم Cellulase الذي يعمل على تحلل الغلاف الخارجي للبذرة مما يسهل عملية إنباتها بالإضافة إلى إفراز مواد تعمل على تحفيز انبات البذور و نموها. وجد Rahman و آخرون (2012) و Petrisor و آخرون (2019) إن معاملة بذور الطماطة و الفلفل الحار برواشح الفطر .*Trichoderma* spp أدى إلى زيادة نسبة انبات البذور و الوزن الجاف لبادراتها و بفارق معنوي عن معاملة المقارنة.

أتفقت هذه النتائج أيضاً مع ما أشارت اليه Ali و آخرون (2014) إلى ان معاملة بذور نبات الحمص برواشح بعض أنواع الفطر .*Trichoderma* spp (*T. harzianum* و *T. viride* و *Trichoderma koningii*) أدى إلى زيادة نسبة الانبات و الوزن الطري و الجاف للبادرات النامية. كما اتفقت هذه النتائج مع ما وجده الزيادي (2011) إلى ان معاملة بذور الطماطة برواشح الفطر *T. harzianum* أدى إلى حصول زيادة معنوية في نسبة الانبات مفسرة ذلك إلى أن للفطر القابلية على انتاج العديد من المواد الأيضية التي تلعب دوراً في تشجيع انبات البذور. كما اتفقت النتائج أيضاً مع ما وجده الاسدي (2020) و فالح (2020) ان نسب الانبات لبذور الطماطة و البطيخ و الرقي و الخيار و الفلفل و الاوزان الجافة لها ازدادت بزيادة تركيز رواشح نفس الأنواع الفطرية المستخدمة في هذه الدراسة (*T. atroviride* و *T. longibrachaitum* و *T. aserellum* و *T. asperelloides*) و التي كان اعلاها عند تركيز الراشح 100%.

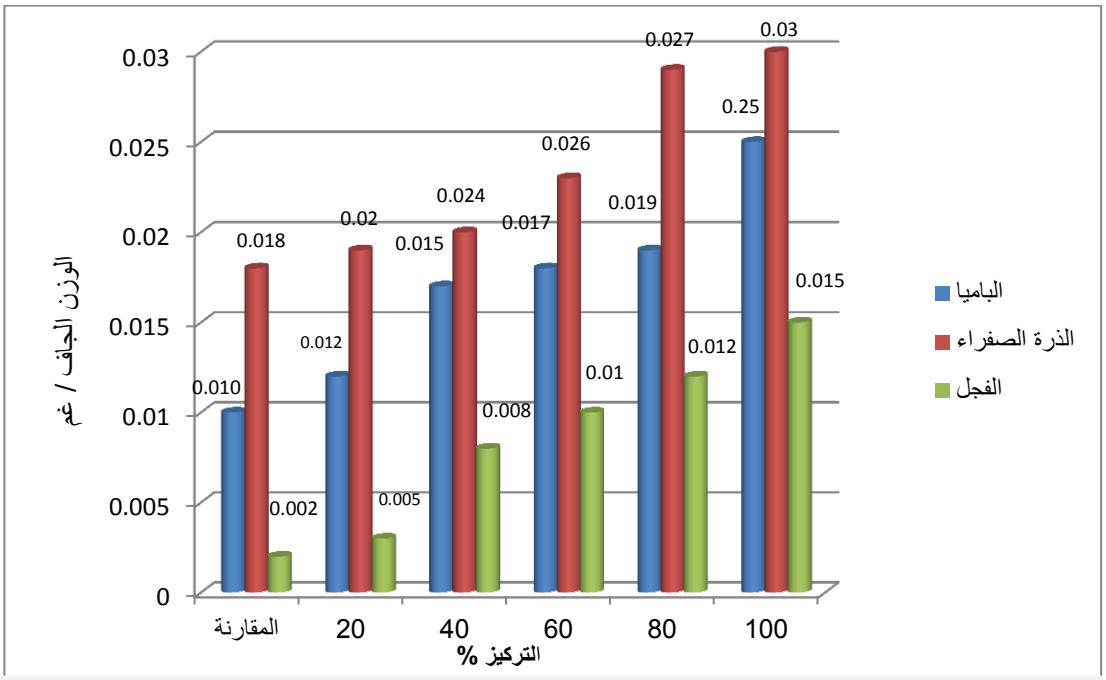
تركيز رواشح الفطر *Trichoderma* spp.			
المقارنة	%20	%100	
			باميا
			ذرة
			فجل

شكل (14) تأثير تراكيز مختلفة (20% و 100%) من رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على انبات بذور الباميا و الذرة و الفجل.



$LSD_{0.05}$	الباميا	الذرة الصفراء	الفجل
	9.686	6.865	10.261

شكل (15) تأثير تراكيز مختلفة من رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في هذه الدراسة على نسبة انبات بذور الباميا و الذرة الصفراء و الفجل.



$LSD_{0.05}$	الباميا	الذرة الصفراء	الفجل
	0.0038	0.0151	0.0039

شكل (16) تأثير تراكيز مختلفة من رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على الوزن الجاف (غم/ بادرة) لنبات الباميا و الذرة و الفجل.

9-4 تأثير تراكيز مختلفة من عنصري المنغنيز المخلبي (MnEDTA) و الحديد المخلبي (FeEDTA) على نمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في اطباق بتري

أظهرت النتائج ان لإضافة المنغنيز(MnEDTA) أو الحديد (FeEDTA) إلى وسط البطاطا دكستروز اكر(PDA) بالتراكيز0.25 و 0.50 و 0.75 و1.00غم مادة تجارية/ لتر تأثيراً واضحاً في زيادة معدلات نمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (جدول5). فيما يتعلق بعنصر المنغنيز(MnEDTA)، فقد وجد ان أعلى معدل (7.87 سم) لنمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. كانت عند أضافته إلى وسط التنمية (PDA) بتركيز 0.75 غم مادة تجارية/ لتر و الذي اختلف بفارق معنوي عن معاملة المقارنة التي بلغ معدل نمو أنواع نفس الفطر 6.80 سم. كما وجد ان الفطر *T. aspirelloides* كانت الاكثر من بين الأنواع الأخرى نمواً (7.52 سم) في الأوساط المعاملة بتراكيز مختلفة من عنصر المنغنيز(MnEDTA)، تلتها *T. atroviride* و *T. asperellum* التي أعطت معدل نمواً وصل إلى 7.40 سم و 7.39 سم، على التوالي. اثبت النتائج أيضاً ان نوع الفطر *T. atroviride* و *T. aspirelloides* كانت الاكثر نمواً من الأنواع الأخرى في الوسط المعامل بالمنغنيز بتركيز 0.75 غم مادة تجارية/ لتر بإعطائها أعلى المعدلات التي بلغت 8.50 و 8.00 سم، على التوالي.

كما لوحظ ان جميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp. كانت الاكثر نموا في الوسط الزرعي (PDA) المعامل بالحديد مقارنة بالمنغنيز و خصوصا عند التركيز 0.75 غم مادة تجارية/ لتر وسط غذائي الذي بلغ فيه معدل نمو الأنواع المختلفة 8.32 سم. وجد أيضاً ان نوع الفطر *T. atroviride* كانت الأسرع نموا في الوسط المعامل بعنصر الحديد و بمعدل وصل إلى 7.98 سم، تلتها الفطر *T. asperellum* التي كان معدل نموها 7.80 سم. ازداد نمو جميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (*T. atroviride* و *T. longibrachaitum* و *T. asperellum* و *T. aspirelloides*) في وسط التنمية بزيادة تركيز عنصر الحديد وصولا إلى أعلاها عند التركيز 0.75 غم مادة تجارية/ لتر و بمعدلات بلغت 8.50 و 8.00 و 8.30 و 8.50 سم، على التوالي.

ان تشجيع نمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في الوسط الغذائي المعامل بعنصر الحديد أو المنغنيز ربما يعود إلى زيادة جاهزية العنصر في وسط التنمية و الذي ربما كان يفتقر وجودة في الوسط الغذائي أو ان جاهزيته كانت بمستويات لا تفي الحاجة الفعلية لنمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. كما قد يرجع سبب تشجيع نمو الفطر في الوسط المعامل بهذه العناصر إلى دور تلك العناصر في تغير الأس الهيدروجيني (pH) للوسط بما يتلائم مع الأس الهيدروجيني المثالي للنمو وزيادة جاهزية العناصر المغذية الضرورية لنمو الفطر وانعكاس ذلك ايجابيا في تشجيع نمو الفطر. اما حالة التثبيط التي أظهرتها تراكيز معينة من هذه العناصر المغذية، فقد تعود إلى زيادة تلك العناصر عن الحد المسموح به مؤديا ذلك إلى

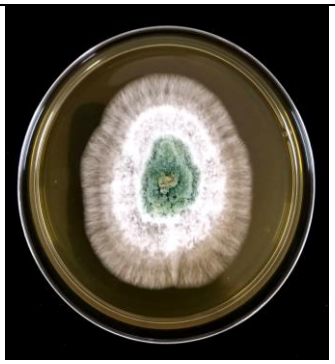
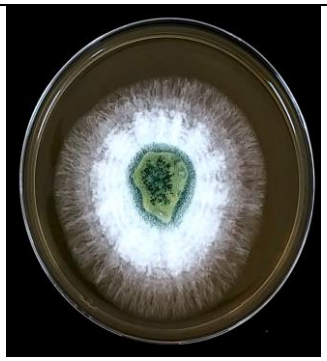
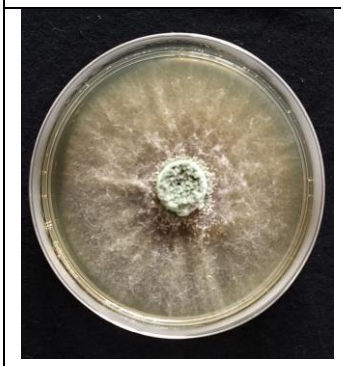
الإخلال بعملية تنافذ الأغشية الخلوية و بالتالي شل العملية الحيوية للخلايا (Dluzniewska، 2008 و Bhaduri و آخرون، 2014).

أتفقت هذه النتائج مع ما أشار اليه Kuccuk و آخرون (2008) و Wanjiru (2009) إلى ان استعمال عنصري الحديد و المنغنيز بتراكيز معينة في الوسط الغذائي Zzapeks Dox أدى إلى تشجيع نمو الفطر *T. harzianum* و بفارق معنوي عن معاملة المقارنة. كما وجد الكعبي (2004) ان لإضافة عنصري المنغنيز و الحديد إلى وسط البطاطا دكستروز اكر (PDA) تأثيراً معنوياً في زيادة معدل نمو الفطر *Alternari asolani* قياساً بمعاملة المقارنة. كما اثبت بربر و آخرون (2016) ان معاملة وسط البطاطا دكستروز اكر (PDA) بعنصري الحديد أو المنغنيز و بالتركيز 0.40 غم مادة تجارية/ لتر وسط غذائي (PDA) تأثيراً مشجعاً لنمو الفطر *T. harzianum* و بمعدل وصل إلى 8.08 سم و الذي اختلف معنويا عن معاملة المقارنة التي بلغ فيها معدل نمو الفطر 6.75 سم. كما بين نفس الباحثون ان الفطر *T. harzianum* قد تمتع بقدرة تضادية عالية في خفض معدلات نمو الفطرين *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersicum* و *R. solani* في الوسط الغذائي (PDA) المعامل بعنصري الحديد و المنغنيز (0.40 غم مادة تجارية/ لتر) عند إضافتهما كلاً على انفراد و بفارق معنوي عن معاملة المقارنة. حقلياً، أشار بربر (2016) ان التداخل بين الفطر *T. harzianum* و عنصر الحديد أو المنغنيز قد حقق كفاءة عالية في حماية بذور و نباتات الطماطة من الإصابة بالفطرين الممرضين *Fusarium oxysporium* f. sp. *Lycopersicum* و *R. solani* و التي انعكست معنوياً في زيادة نسبة انبات البذور و طول النبات و الأوزان الجافة للمجموعين الخضري و الجذري لنبات الطماطة قياساً بمعاملة المقارنة الملوثة فقط بالفطرين الممرضين. وجد ان لإضافة الألمنيوم والنيكل و النحاس و الزنك و الكوبالت و الكادميوم و الرصاص و المنغنيز و الحديد و الزئبق تأثيراً فعالاً في زيادة النشاط الانزيمي و تشجيع نمو الغزل الفطري و التجرثم لأنواع مختلفة من الفطر *Trichoderma* spp. و منها *T. aureoviride* و *T. harzianum* و *T. viride* (Kredics و آخرون، 2001). على ضوء ما توصلت آلية نتائج هذه التجربة، فقد تم اختيار عنصر الحديد (كمادة تجارية) في اغناء القيمة الغذائية الضرورية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. في الوسط التخمري لمسحوق نبات الخباز و الذي اختير من بين الاوساط التخمرية الاخرى (الازولا و سعف النخيل و كوالح الذرة و الثيل و التبن) لإكمال خطوات تصنيع المبيد الحيوي.

جدول (5) تأثير اضافة المنغنيز المخلبي (MnEDTA) و الحديد المخلبي (FeEDHA) على نمو أنواع الفطر .*Trichoderma* spp (سم) في وسط البطاطا دكستروز اكر (PDA).

التركيز (غم/ لتر) / الأنواع الفطرية		تراكيز المنغنيز (MnEDTA) و الحديد (FeEDHA) (غم مادة تجارية/ لتر)					
		0.00 (المقارنة)	0.25	0.50	0.75	1.00	المعدل
المنغنيز	*T. atroviride*	6.50*	7.00	7.83	8.50	7.16	7.39
	T. longibrachaitum	6.83	7.16	7.20	7.40	7.30	7.17
	T. asperellum	6.90	7.60	7.90	7.60	7.00	7.40
	T. aspirelloides	7.00	7.75	7.90	8.00	7.20	7.52
الحديد	*T. atroviride*	6.50	7.80	8.0	8.5	8.1	7.98
	T. longibrachaitum	6.83	6.90	7.9	8.0	7.6	7.26
	T. asperellum	6.90	7.90	8.0	8.3	7.9	7.80
	T. asperelloides	7.00	7.75	7.9	8.5	7.8	7.69
المعدل		6.80	7.48	7.82	8.10	7.50	
LSD0.05 للمنغنيز		لأنواع الفطر 0.293		للتراكيز 0.330		للتداخل 0.619	

*كل رقم بالجدول يمثل معدل لثلاث مكررات.

	T. longibrachaitum	*T. asperellum*	*T. aspirelloides*	*T. atroviride*
المقارنة				
الحديد				
المنغنيز				

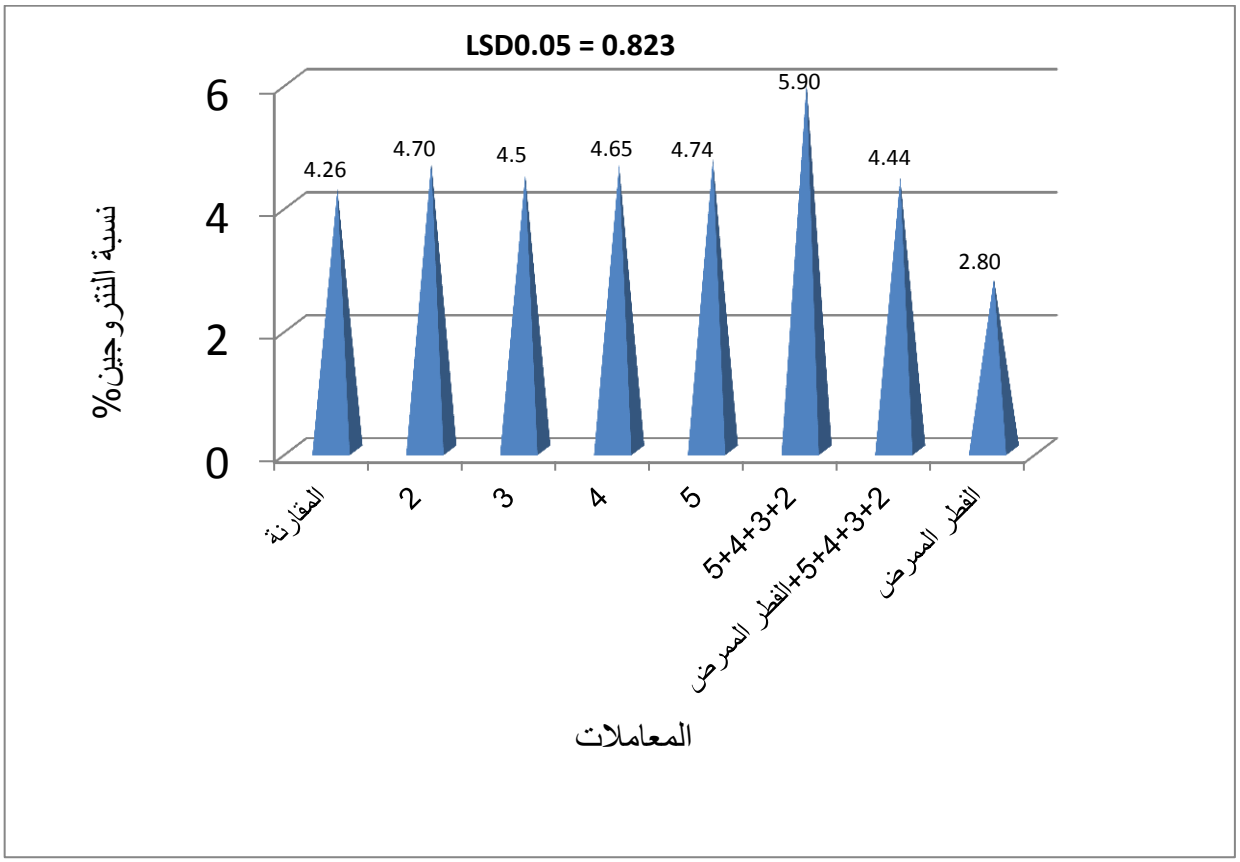
شكل (17) تـأثير اضـافة المنغنيـز (MnEDTA) و الحديد (FeEDHA) إلـى الوسـط الزرعـي (PDA) بتركيز 0.75 غم مادة تجارية/ لتر على نمو الفطريات *T. atroviride* و *T. longibrachaitum* و *T. asperellum* و *T. aspirelloides*.

4-10 تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و الفطر الممرض *F. culmorum* على محتوى النبات من العناصر المعدنية النتروجين و البوتاسيوم و الفسفور

4-10-1 عنصر النتروجين

أظهرت النتائج ان النباتات النامية في ترب ملوثة بأنواع الفطر *Trichoderma* spp. بشكل منفرد أو مشـترك تـأثيراً واضـحاً فـي زيـادة محتواهـا مـن عنصـر النتـروجين، فقد وجـد أعلـى نسـبة للنيتـروجين

(5.90%) كانت في النباتات النامية في التربة الملوثة بجميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5)، تلتها النباتات النامية في تربة ملوثة بنوعي الفطر *Trichoderma* spp. 2 و 5 التي بلغت نسبة النيتروجين فيها 4.70 % و 4.74 %، على التوالي. أثبتت النتائج أيضاً ان اقل وجود لعنصر النتروجين كان في النباتات المعاملة بالفطر الممرض *F. culmorum* لوحده و بنسبة بلغت 2.80 %، و التي ارتفعت لتصل إلى 4.44 % عند وجود جميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في نفس التربة و التي فاقت محتوى نفس العنصر في النباتات النامية في معاملة المقارنة (الخالية من أي فطر) و التي بلغت فيها نسبة النتروجين 4.26 % (شكل 18).

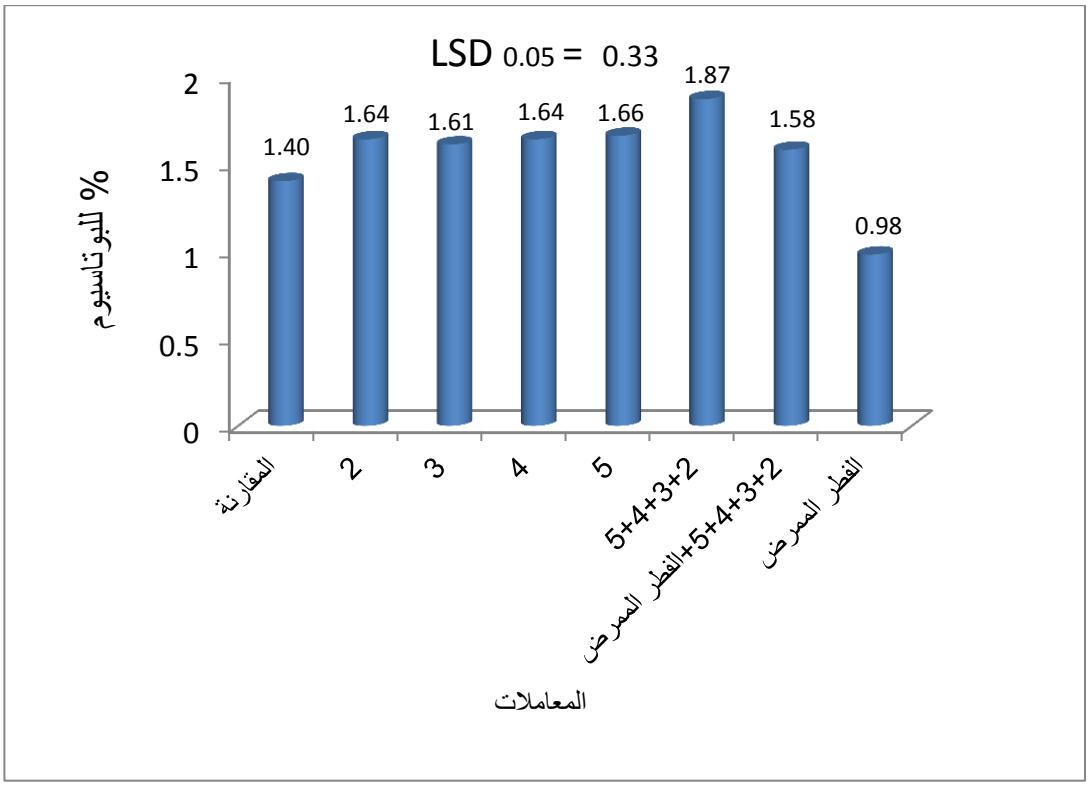


شكل (18) تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) و الفطر الممرض *F. culmorum* على محتوى نبات الباميا من عنصر النتروجين (%). (2) الفطر *T. atroviride*; (3) الفطر *T. longibrachaitum*; (4) الفطر *T. asperellum*; (5) الفطر *T. aspirelloides*.

4-10-2 عنصر البوتاسيوم

أثبتت النتائج وجود اختلافات واضحة في تأثير المعاملات المختلفة في محتوى النبات من البوتاسيوم، حيث بلغ أعلى معدل له (1.87%) في النباتات النامية في تربة ملوثة بجميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و الذي اختلف معنويا عن محتواه في نباتات معاملة المقارنة (الخالية من أي عزلة فطرية)، تلتها النباتات المعاملة بنوعي الفطر *Trichoderma* spp. 2 و 5 و التي بلغ فيها مستوى عنصر

البوتاسيوم 1.64% و 1.66%، على التوالي. أوضحت النتائج أيضاً ان اقل مستوى للبوتاسيوم كان في النباتات النامية في تربة ملوثة بالفطر الممرض *F. culmorum* (0.98%) و الذي اختلف بفارق معنوي عن محتوى نفس العنصر في نباتات معاملة المقارنة و الذي بلغ 1.40%. كما أظهرت النتائج ان لوجود أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) في نفس التربة تأثيرا معنويا في تثبيط الفطر الممرض و اسهامها في زيادة محتوى النبات من عنصر البوتاسيوم و بمعدل بلغ 1.58% (شكل 19).



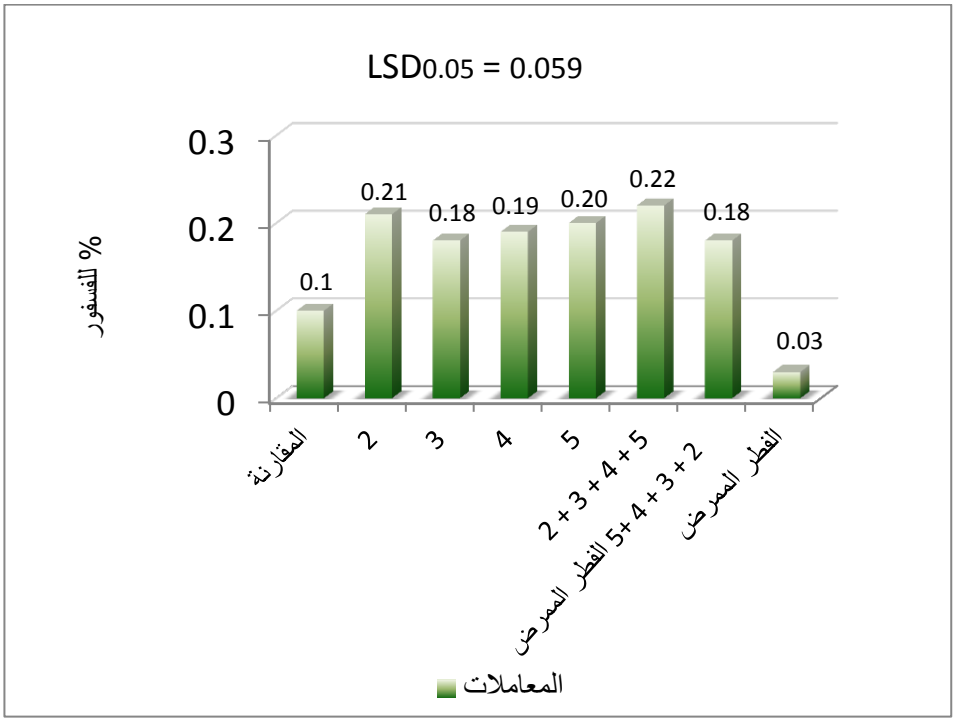
شكل (19) تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و و4 و 5) و الفطر الممرض *F. culmorum* على محتوى نبات الباميا من عنصر البوتاسيوم. (2) الفطر *T. atroviride*; (3) الفطر *T. longibrachaitum* (4) الفطر *T. asperellum*; (5) الفطر *T. aspirelloides*.

3-10-4 الفسفور

أوضحت نتائج التحليل المثبتة في الشكل (20) ان اقل معدل لمحتوى النبات من عنصر الفسفور كان في النباتات النامية في تربة ملوثة بالفطر الممرض *F. culmorum* و بنسبة بلغت 0.03% و اختلفت معنوياً عن محتوى نفس العنصر في النباتات النامية في التربة المعقمة (معاملة المقارنة). كما لوحظ ان لوجود جميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) مع الفطر الممرض دوراً واضحاً في حصول زيادة معنوية في محتوى النبات من عنصر الفسفور و بنسبة بلغت 0.18%.

بينت النتائج أيضاً ان لوجود أنواع الفطر *Trichoderma* spp. بشكل منفرد أو مشترك دوراً في زيادة محتوى النبات من عنصر الفسفور الذي بلغ أعلى معدلاً له (0.22%) في النباتات النامية في تربة

ملوثة بأنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5)، تلتها النباتات النامية في تربة ملوثة بنوع الفطر *Trichoderma* spp. (2) و التي وصل فيها محتوى النبات من عنصر الفسفور إلى 0.21%. كما كان لأنواع الفطر الأخرى (3 و 4 و 5) المضافة إلى التربة بشكل منفرد دوراً واضحاً في زيادة محتوى النبات من عنصر الفسفور بنسب بلغت 0.18% و 0.19% و 0.20%، على التوالي و التي اختلفت بفارق معنوي عن معاملة المقارنة الخالية من أي فطر و التي بلغ محتوى نباتاتها من عنصر الفسفور 0.10% (شكل 20).



شكل (20) تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) و الفطر الممرض *F. culmorum* على محتوى نبات الباميا من عنصر الفسفور. (2) الفطر *T. atroviride*; (3) الفطر *T. longibrachaitum* (4) الفطر *T. asperellum*; (5) الفطر *T. aspirelloides*.

على ضوء ما أثبتته نتائج هذه التجربة، اثبت ان للفطر الممرض *F. culmorum* تأثيراً واضحاً على امراضية النبات و زيادة إجهاده و تأثيره على العمليات الحيوية و الفسيولوجية في النبات التي أدت بدورها إلى خفض قدرة النبات على امتصاص العناصر المعدنية (النيتروجين و البوتاسيوم و الفسفور) المتوفرة في التربة و الذي أدى إلى انخفاض تراكيزها في النبات. في دراسة سابقة، اثبت Jain و Goswami (2002) أن النباتات النامية في ترب ملوثة ببعض أنواع الفطر *Fusarium* spp. قد انخفض محتواها معنوياً من بعض العناصر المعدنية و منها النتروجين و الفسفور و البوتاسيوم.

بينت نتائج هذه الدراسة أيضاً أن لإضافة أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) بشكل منفرد أو مشترك دوراً واضحاً في زيادة محتوى نباتات الباميا من النيتروجين و البوتاسيوم و

الفسفور حتى عند وجود الفطر الممرض (*F. culmorum*) و اختلافها عن محتوى النباتات النامية في تربة ملوثة بنفس الفطر الممرض فقط. ذكر في دراسات اخرى امكانية العديد من الكائنات الحية المجهرية و من بينها بعض أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في إذابة و زيادة جاهزية العناصر المعدنية الضرورية لنمو النبات و منها الكالسيوم و النيتروجين و الفسفور، فضلا عن دورها في تحليل المخلفات النباتية و المواد العضوية و جعلها أكثر جاهزية للنبات (Harman و آخرون، 2004; Benitez و آخرون، 2004).

تتميز بعض أنواع الفطر *Trichoderma* spp. بقابليتها على إفراز بعض الانزيمات مثل 1)-β،-(6 glucanases و Chitinases و Proteases المحللة للمواد العضوية الموجودة أو المضافة إلى التربة و بالتالي زيادة جاهزية العديد من العناصر المهمة للنبات مثل النتروجين و الفسفور و البوتاسيوم و الزنك و الحديد و انعكاس ذلك على ايجابياً صحة النبات و مقاومته للإمراض (Akrami و Zohreh، 2015). كما اتفقت نتائج هذه الدراسة مع ما أشار إليه Yedidia و آخرون (2001) إلى حدوث زيادة معنوية في محتوى النبات من عنصر الفسفور عند المعاملة ببعض أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و لدورها بإذابة بعض المركبات التي تحتوي على الفسفور في تركيبها و جعلها اكثر جاهزية للنبات. و في دراسة أخرى، وجد Xia و آخرون (2018) أن نباتات الطماطة النامية في تربة ملوثة ببعض أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و منها *T. harzianum* و *T. atroviride* و *T. asperelloides* كانت الأكفأ في امتصاص عنصر النيتروجين و الفسفور من تلك النامية في تربة خالية من تلك الأنواع. كما اثبت ان للمواد الأيضية المنتجة من قبل بعض أنواع الفطريات و منها الفطر *Trichoderma* spp. دوراً مهما في جعل بعض العناصر المعدنية بحالة مخلبية غير قابلة للاتحاد مع مركبات كيميائية اخرى و بحالة جاهزة للامتصاص من قبل النبات (Datnoff و آخرون، 2000).

4-11 تأثير أنواع الفطر *Trichodrma* spp. و الفطر الممرض *F. culmorum* على فعالية نبات الباميا من الانزيمات البيروكسيديز (Peroxidase) و الكاتاليز (Catalase)

4-11-1 انزيم البيروكسيديز (Peroxidase)

أظهرت النتائج ان لوجود أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) بشكل منفرد أو معاً تأثيراً ايجابياً في زيادة فعالية نباتات الباميا من انزيم البيروكسيديز (Peroxidase, POD) مقارنة بالنباتات النامية في تربة غير ملوثة بأي من الفطريات (جدول 6 و شكل21). وجد ان أعلى مستوى لإنزيم البيروكسيديز (POD) كان في النباتات النامية في تربة ملوثة بجميع أنواع الفطر *Trichodrma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) و الفطر الممرض *F. culmorum* و بمعدل بلغ 6.87 وحدة. ملغم بروتين$^{-1}$ و التي اختلفت بفارق معنوي عن معاملة المقارنة (الخالية من وجود أي فطر) التي وصل فيها تركيز هذا الأنزيم

إلى 0.14 وحدة. ملغم بروتين$^{-1}$. تبين أيضاً ان نوع الفطر *Trichodrma* spp. (5) كانت الأفضل من بين الأنواع الأخرى (2 و 3 و 4) في زيادة مستوى انزيم البيروكسيديز (POD) و بمعدل بلغ 1.07 وحدة. ملغم بروتين$^{-1}$ و اختلف معنوياً عن مستوى الانزيم (POD) في النباتات النامية في تربة ملوثة بأنواع فطر المقاومة الاحيائية 2 و 3 و 4 و بشكل منفرد و التي بلغ فيها مستوى الانزيم 0.46 و 0.75 و 0.47 وحدة. ملغم بروتين$^{-1}$، على التوالي بوجود الأنواع المذكورة اعلاه.

أظهرت النتائج ارتفاع مستوى انزيم البيروكسيديز (POD) بشكل واضح في نباتات الباميا النامية في تربة ملوثة بالفطر الممرض (*F. culmorum*) فقط و بمعدل وصل إلى 4.35 وحدة. ملغم بروتين$^{-1}$ و بفارق معنوي عن معاملة المقارنة (0.14 وحدة. ملغم بروتين$^{-1}$). انخفض التأثير السلبي لوجود الفطر الممرض بوجود أنواع الفطر *Trichodrma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) و التي أسهمت برفع مستوى انزيم البيروكسيديز (POD) إلى 6.87 وحدة. ملغم بروتين$^{-1}$ بمستوى أعلى بكثير من مستواه في النباتات النامية في معاملة المقارنة (0.14 وحدة. ملغم بروتين$^{-1}$) (شكل 21).

بين Yamaguchi و آخرون (1995) و Shahbazi و آخرون (2009) ان مستوى و فعالية انزيم البيروكسيديز تزداد في النبات كردة فعل ضد أي إجهاد يتعرض له النبات لمنع حدوث أي أضرار. ينتج الفطر *Trichoderma* spp. بعض الببتيدات و البروتينات و الأنزيمات كانزيم Peroxidase و كذلك بعض المركبات الواطئة الوزن الجزيئي التي تسهم في تحفيز الآليات الدفاعية في النبات مما ينتج عنها زيادة في انتاج بعض المركبات الفينولية و الكحولية ذات التأثير التثبيطي للمسببات المرضية (Reino و آخرون، 2007). كما ذكر نهال (2011) أن للفطر *Trichoderma* spp. قدرة في تحفيز المقاومة الجهازية في نبات اللوبيا (*Vigna unguiculata*) من خلال زيادة فعالية انزيم الـ Peroxidase و كذلك الـ Cellulase ضد الفطر *M. phaseolina* . اوضح Kilonzi و آخرون (2020) و Mohamed و آخرون (2020) أن للفطر *T. asperellum* كفاءة عالية في السيطرة على مرض اللفحة المتأخرة على الطماطة المتسببة عن الفطر *Phytophthora Infestans* من خلال تحفيزه للمقاومة الجهازية في النبات و زيادة محتواه في الفينولات و حامض السالسليك (Salicylicacid) و تحفيز بعض الانزيمات مثل Peroxidase و Oxidase و Lipoxygenase.

4-11-2 انزيم الكاتاليز (Catalase)

أثبتت النتائج تأثير المعاملات المختلفة في محتوى نباتات الباميا من انزيم الكاتاليز (Catalase)، إذ لوحظ ان أعلى مستوى لهذا الإنزيم كان في النباتات النامية في تربة ملوثة بأنواع الفطر *Trichodrma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) و الفطر الممرض *F. culmorum* و البالغ 322.32 وحدة. ملغم. بروتين$^{-1}$، تلتها و بفارق معنوي عن المعاملة بأنواع الفطر *Trichodrma* spp. 2 و 3 و 4 التي بلغ فيها مستوى

الانزيم 78.60 و 95.00 و 114.60 وحدة. ملغم. بروتين$^{-1}$، على التوالي (شكل 21). و كان مستوى هذا الانزيم في النباتات النامية في تربة ملوثة بالفطر الممرض *F. culmorum* لوحدة و الذي بلغ 181.80 وحدة. ملغم. بروتين$^{-1}$ و بفارق معنوي عن معاملة المقارنة 62.40 وحدة. ملغم. بروتين$^{-1}$. اختلف هذا التأثير و بشكل واضح عند وجود أنواع الفطر *Trichodrma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) التي ساهمت و بشكل معنوي برفع مستوى الانزيم إلى 122.40 وحدة. ملغم. بروتين$^{-1}$ و بمستوى أعلى مما في النباتات النامية في معاملة المقارنة (تربة غير ملوثة باي فطر) أو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) عند استعمالها بشكل منفرد في تلويث التربة (شكل 21 و جدول 6).

أشار Elad و آخرون (2000) و Harman و آخرون (2004) و Dana و آخرون (2004) إلى أن أنواع الفطر *Trichodrma* spp. لها القابلية على تحفيز آليات النبات الدفاعية ضد العديد من الظروف البيئية المتطرفة و المسببات المرضية مثل الفطريات و البكتريا من خلال زيادة تركيز و فاعلية العديد من الانزيمات التي تمتلك دوراً دفاعياً للبنات. كما اتفقت نتائج هذه الدراسة مع ما وجده Christopher و آخرون (2010) بأن معاملة نباتات الطماطة بالفطر *T. virens* و الفطر الممرض *F. oxysporum* f.sp. *lycopIersici* قد حفز النبات على انتاج بعض الانزيمات الدفاعية مثل Peroxidase (POD) و Polyphenol oxidase و Phenylalanine ammonialyas بشكل اكبر مما هو في معاملة المقارنة المعاملة بالفطر *F. oxysporum* f.sp. *lycopIersici* و الذي كانت فيه فعالية الانزيمات مرتفعة اكثر من المعاملة بدون اي اضافة للفطريات.

جدول(6) تأثير أنواع الفطر .*Trichodrma* spp و الفطر الممرض *F. culmorum* على محتوى نبات الباميا من الانزيمات البيروكسيديز (Peroxidase) و الكاتاليز (Catalase).

المعاملة	البيروكسيديز (Peroxidase)	الكاتاليز (Catalase)
المقارنة (بدون فطر)	*0.14	62.40
T. atroviride	0.46	78.60
T. longibrachaitum	0.75	95.00
T. asperellum	0.47	114.60
T. aspirelloides	1.07	119.40
أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5)	2.81	122.40
أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) + الفطر *F. culmorum*	6.87	322.32
الفطر الممرض (*F. culmorum*)	4.35	181.80
$LSD_{0.05}$	0.194	2.637

*كل رقم في الجدول يمثل معدل لثلاث مكررات.
حيث أن (2) الفطر *T. atroviride*; (3) الفطر *T. longibrachaitum*; (4) الفطر *T. asperellum* (5) الفطر *T. aspirelloides*.

12-4 تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في هذه الدراسة على محتوى النبات من بعض الهرمونات النباتية

1-12-4 حامض الأبسيسك (Abscisic acid)

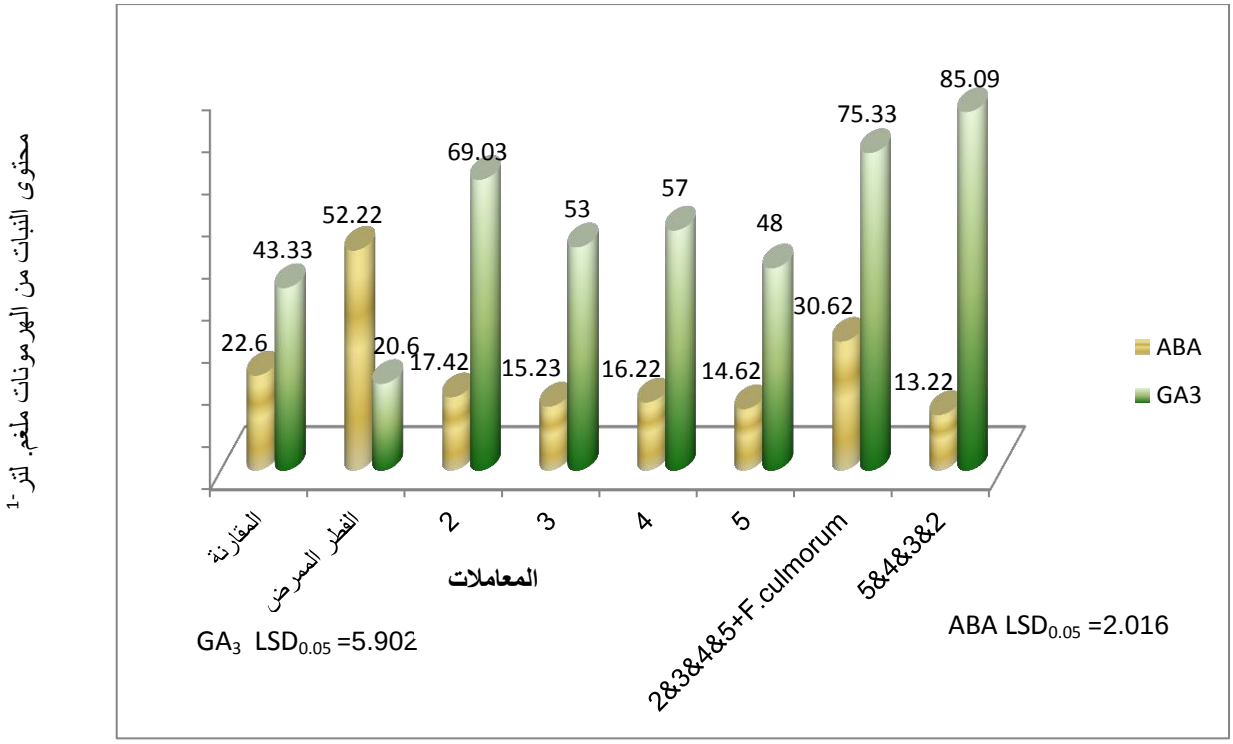
بينت النتائج ان لأنواع الفطر .*Trichoderma* spp تأثيراًمعنوياً في خفض محتوى نبات الباميا من هرمون الابسيسك اسد (Abscisic acid) و كان أقل مستوى له في النباتات النامية في التربة الملوثة بجميع أنواع الفطر .*Trichoderma* spp و بمعدل وصل إلى 13.22 ملغم . لتر$^{-1}$ و الذي اختلف بشكل معنوي عن محتواه في النباتات النامية في معاملة المقارنة التي بلغ معدلها 22.60 ملغم . لتر$^{-1}$. كما لوحظ ان وجود أنواع الفطر .*Trichoderma* spp (2 و 3 و 4 و 5) بشكل منفرد قد أدى إلى انخفاض معنوي في محتوى النبات من هرمون حامض الابسيسك (Abscisic acid) و بمعدلات تراوحت بين 14.62 – 17.42 ملغم. لتر$^{-1}$. كما اثبتت النتائج ان مستوى هرمون حامض الابسيسك قد ارتفع في النباتات المصابة

و النامية في تربة ملوثة بالفطر الممرض *F. culmorum* حيث بلغ 52.22 ملغم. لتر$^{-1}$ و انخفض هذا المستوى بوجود أنواع الفطر *Trichoderma* spp. بشكل مجتمع وصل إلى 30.62 ملغم. لتر$^{-1}$ في النباتات النامية في تربة ملوثة بالفطر الممرض *F. culmorum* و جميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp.

4-12-2 حامض الجبرلين (Gibberellic acid)

أثبتت النتائج ان لوجود أنواع الفطر *Trichoderma* spp. دورا واضحاً في زيادة محتوى النبات من هرمون الجبرلين (GA_3) و الذي كان أعلى مستوى له (85.09 ملغم . لتر$^{-1}$) في النباتات النامية في تربة ملوثة بجميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp. قياساً بمحتواه في نباتات المقارنة (غير الملوثة بأي فطر) و الذي بلغ 43.33 ملغم . لتر $^{-1}$. كما وجد ان للفطر *F. culmorum* تأثيراً واضحاً في خفض محتوى النبات من هرمون الجبرلين إلى 20.60 ملغم . لتر$^{-1}$ و انخفض هذا التأثير بشكل معنوي عند وجود جميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في نفس التربة الملوثة بالفطر الممرض *F. culmorum* ليصل محتوى النبات من هرمون الجبرلين إلى 75.33 ملغم . لتر$^{-1}$ و بزيادة معنوية عن مستوى هرمون الجبرلين (43.33 ملغم . لتر$^{-1}$) في النباتات النامية في معاملة المقارنة (الخالية من أي فطر) (شكل 22).

وجد في دراسة سابقة ان معاملة نبات الـ Arabidopsis بأنواع من الفطر *T. virens* أو *T. atroviride* أدى إلى حدوث زيادة معنوية في تركيز هرمون الابسيسك اسد (ABA) في البراعم و بفارق معنوي عن تركيزه في النباتات غير المعاملة بأي فطر عند تعريض النباتات إلى الاجهاد (Contreras-Cornejo و آخرون، 2015). كما اتفقت هذه النتائج مع ما ذكره العامري و آخرون (2018) بان معاملة صنفين (Hapil و Fastivil) من نبات الشليك (*F. x ananassa*) بالفطريات الممرضة *F. culmorum* و *Cylindrocarpon* spp. و *Bipolaris* spp. أدى إلى خفض واضح في محتوى النبات من هرمون الجبرلين (AG_3) و حامض الاندول (Indol acetic acid, IAA) قياساً بمعاملة المقارنة. كما أشاروا أيضاً إلى ان التأثير السلبي للفطريات الممرضة على محتوى تلك الهرمونات النباتية قد انخفض عند وجود بعض فطريات المقاومة مثل الفطر *T. harzianum* و البكتريا *Pseudomonas* spp.



شكل(22) تأثير أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في هذه الدراسة على محتوى نبات الباميا من هرمون الابسيسك اسد (Abscisic acid) و هرمون الجبرلين (Gibberellic acid).

13-4 تأثير تراكيز مختلفة من المبيد الكيميائي Topsin M في نمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و الفطر الممرض *F. culmorum* في الوسط الزرعي PDA

بينت نتائج اختبار تراكيز مختلفة من المبيد الكيميائي Topsin M ان هناك تأثيرات متفاوتة في نمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و كذلك الفطر الممرض *F. culmorum* في أطباق بتري، فقد تبين ان نوع الفطر *Trichoderma* spp. (5) كانت أكثر تحملا للمبيد Topsin M من بين الأنواع الأخرى و منها عزلة الفطر الممرض *F. culmorum* باعطائها اقل نسبة تثبيط و التي بلغت 26.76%، في حين تراوحت نسب التثبيط في بقية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. الاخرى (2 و 3 و 4) بين 40.38% - 71.56%. كما أثبتت النتائج فعالية المبيد الكيميائي Topsin M و بشكل معنوي ضد الفطر الممرض و بإعطائه أعلى نسبة تثبيط (80.39%) و التي اختلفت بفارق معنوي عن نسب التثبيط التي أظهرها نفس المبيد ضد أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المختبرة في الدراسة (جدول 7).

أما بالنسبة لتأثير تراكيز المبيد المختلفة (0.25 و 0.50 و 0.75 و 1.00 و 1.25 مل/ لتر)، فقد تبين ان جميع الأنواع الفطرية المختبرة ازداد تثبيطها مع زيادة تركيز المبيد المضاف إلى الوسط الزرعي (PDA) و بنسب تثبيط بلغت 27.74% و 54.57% و 61.76% و 84.70% و 100.00% عند التراكيز اعلاه على التوالي. أوضحت النتائج أيضاً ان جميع العزلات الفطرية و من بينها عزلة الفطر *F.*

culmorum لم تتمكن في النمو في الوسط الزرعي المعامل بالمبيد بتركيز 1.00 مل/ لتر باستثناء نوع الفطر *Trichoderma* spp. (5)، التي انفردت بإمكانية نموها عند وجود المبيد بهذا التركيز و بنسبة تثبيط بلغت 23.52 % (شكل 23). هذا و اخذ التأثير التثبيطي للمبيد بالانخفاض مع انخفاض تركيز المبيد المضاف و صولاً إلى التركيز 0.25 مل/ لتر، الذي أعطى تثبيطاً قليلاً لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. المختلفة (2 و 3 و 4 و 5) و بنسب بلغت 9.41% و 29.40% و 11.70% و 5.88% و 82.35%، على التوالي، في حين لوحظ ان هنالك تثبيطاً واضحاً للفطر الممرض *F. culmorum* بلغ 82.35% عند نموه في الوسط المعامل بنفس تركيز المبيد.

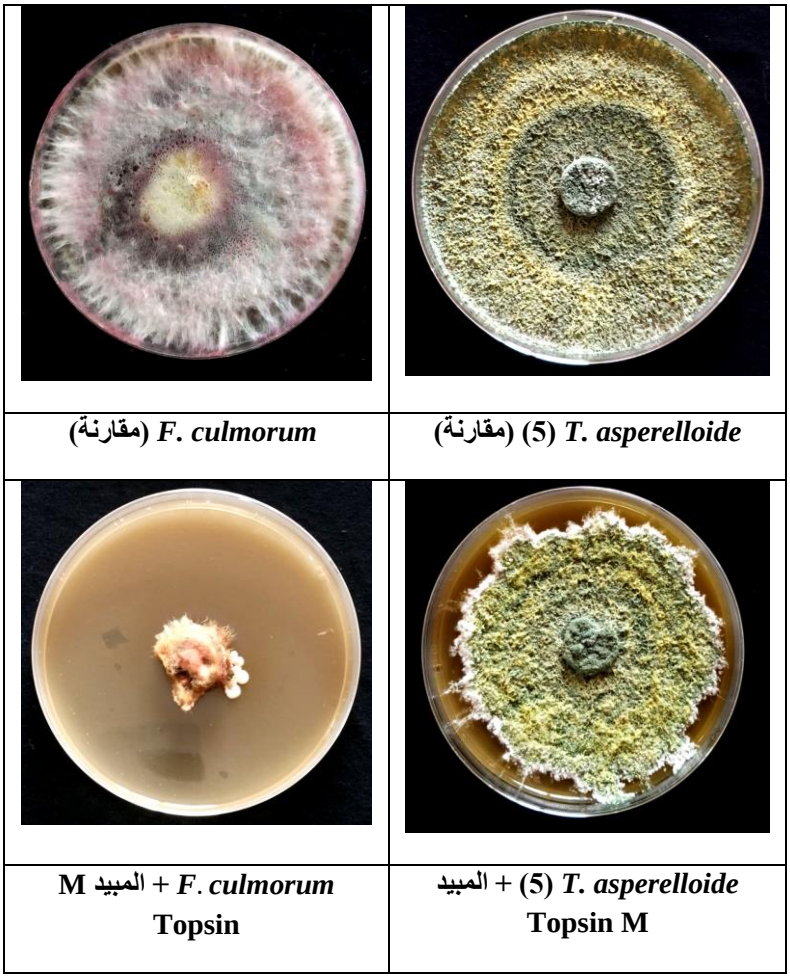
قد يعود سبب التأثير التثبيطي للمبيد الكيميائي Topsin M إلى فعاليته في تكوين مركبات مخلبية مع النحاس في أنسجة النبات العائل و سهولة دخوله إلى خلايا الفطر مما يؤدي إلى قتلها (Meister، 2000). اتفقت نتائج هذه الدراسة مع العديد من الدراسات التي أثبتت فعاليته المبيد Topsin M في تثبيط الكثير من الفطريات الممرضة مثل *F. oxysporum* و *F. solani* و *R. solani* و *M. phasseolina* (Al-Khafagi، 2012). كما برهنت دراسات سابقة امكانية تحمل أنواع مختلفة من الفطر *Trichoderma* spp. و منها *T. harzianum* و *T. viride* التراكيز المنخفضة من بعض المبيدات الكيميائية مثل المبيد Sancozeb (400 جزء بالمليون) و Curzate (600 جزء بالمليون) و Mancozeb (100 جزء بالمليون)، في حين أظهرت التراكيز الأعلى منها تثبيطاً واضحاً في نمو تلك الأنواع الفطرية (الطويل، 2010; Wedajo، 2015). كما وجد الاسدي (2020) ان استعمال المبيد الكيميائي Beltanol مع اوكسيد المغنيسيوم النانوي بتركيز (0.25) مل/ لتر و 2.5 غم/ لتر، على التوالي و كان الاقل تأثيراً على أنواع الفطر *T. longibrachaitum* و *T. asperellum* و *T. aspirelloides* مقارنة بتثبيط الفطر الممرض *F. brachygibbosum*. ان قلة تأثير المبيد الكيميائي Topsin M على أنواع الفطر *Trichoderma* spp المستخدمة في هذه الدراسة خصوصاً عند التركيز الواطئ (0.25 مل/ لتر) من المبيد يشجع إدخاله في برامج مكافحة متكاملة مع هذه الأنواع لمقاومة مسببات مرضية مختلفة و منها الفطر *F. culmorum* المعزول في هذه الدراسة.

جدول (7) تأثير تراكيز مختلفة من المبيد الكيميائي Topsen M على نمو أنواع الفطر . *Trichoderma* spp و الفطر الممرض *F. culmorum* في اطباق بتري.

التراكيزمل/ لتر / العزلات	% للتثبيط					
	المقارنة	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	المعدل
2	0.00	9.41	14.11	18.80	100.00	100.00	40.38
3	0.00	29.40	100.00	100.00	100.00	100.00	71.56
4	0.00	11.70	47.00	70.50	100.00	100.00	54.86
5	0.00	5.88	11.76	19.50	23.52	100.00	26.76
F. culmorum	0.00	82.35	100.00	100.00	100.00	100.00	80.39
المعدل	0.00	27.74	54.57	61.76	84.70	100.00	
LSD0.05	للعزلات 13.261		للتراكيز 14.826		للتداخل 1.796		

*كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات.

(2) الفطر *T. atroviride*; (3) الفطر *T. longibrachaitum*; (4) الفطر *T. asperellum*; (5) الفطر *T. aspirelloides*



شكل (23) تأثير المبيد الكيميائي Topsin M (0.25 غم/ لتر) على نمو الفطر نوع (5) *T.asperelloides* و الفطر الممرض *F. culmorum* في أطباق بتري.

14-4 تأثير المبيد الكيميائي Topsin M و أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في إنبات بذور و نمو بادرات الباميا و الوزن الجاف لها في الاصص البلاستيكية

أثبتت النتائج الواردة في جدول (8) أن المعاملة بالفطر *F. culmorum* أدت إلى انخفاض معنوي في بنسب انبات البذور (36.33%) و موت بادرات الباميا (52.77%) و انخفاض واضح بمعدل الوزن الجاف للبادرات النامية (0.072 غم) عند مقارنتها مع معاملة المقارنة (90.00% و 1.03 غم/ نبات و 0.00%، على التوالي). انخفض التأثير السلبي للفطر الممرض عند وجود المبيد الكيميائي Topsin M أو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. لترتفع نسب الانبات إلى 86.66% و 83.33%، على التوالي، بالإضافة إلى انخفاض نسبة موت البادرات إلى 8.33% و 0.00%، على التوالي. وجد ان هناك تأثير واضح على الفطر الممرض عند التداخل بين المبيد الكيميائي Topsin M و أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في زيادة نسبة الانبات (96.66%) و الوزن الجاف (1.50 غم/ بادرة) و بتفوق قليل على تلك التي سجلت في معاملة المقارنة (الخالية من اي فطر). حقق المبيد Topsin M زيادة واضحة في نسبة انبات

بذور الباميا و الوزن الجاف لبادراتها النامية في تربة موبوءة بالفطر الممرض (*F. culmorum*) و يعود السبب إلى آلية المبيد في تكوين مركبات مخلبية (Chelating compounds) مع النحاس لتسهيل وصول المبيد إلى داخل خلايا الفطر الممرض لإحداث التأثير القاتل للمبيد (Meister، 2000).

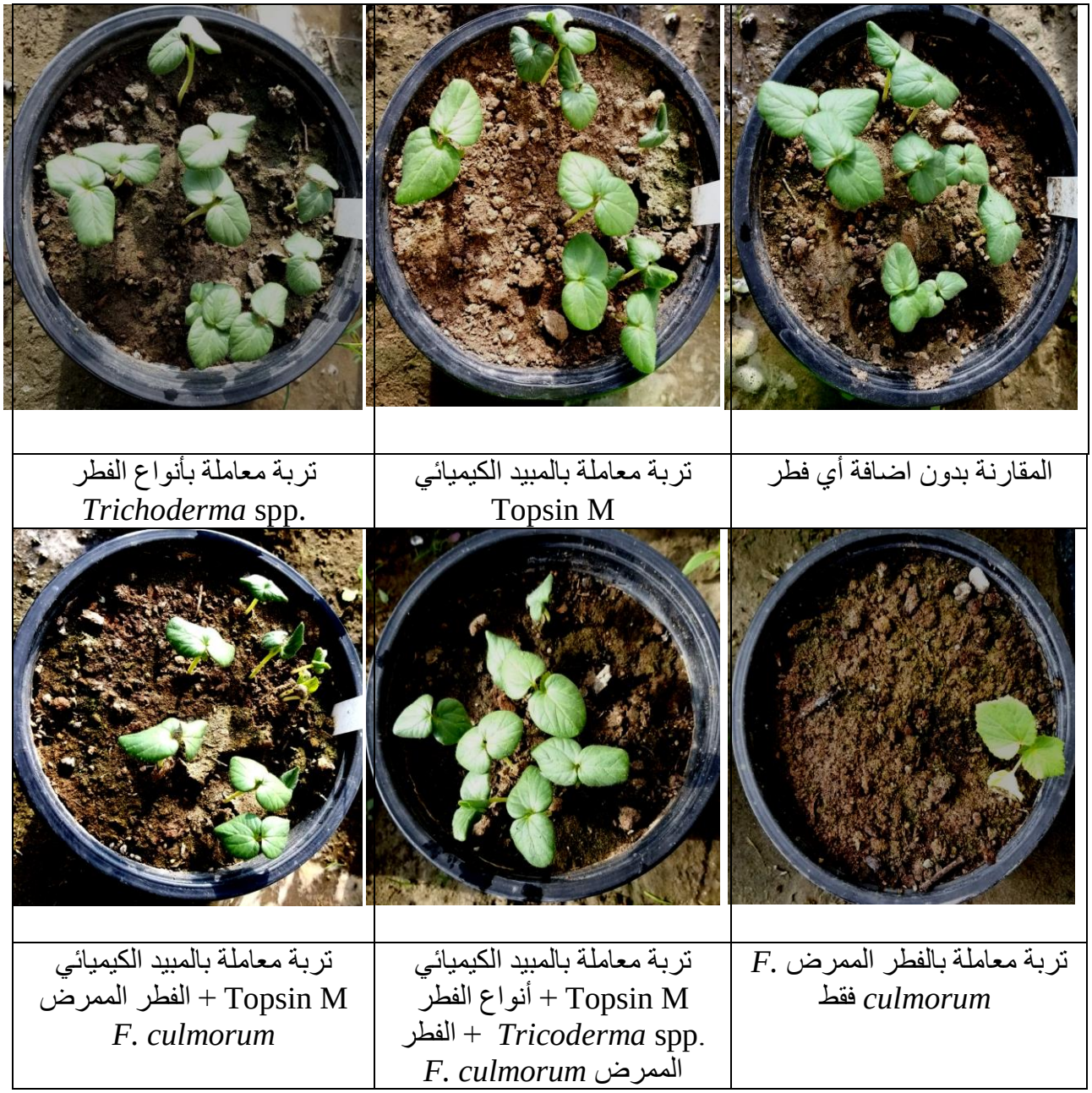
أثبتت تجارب سابقة ان لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. فعالية عالية في مقاومة المسببات المرضية و ذلك لامتلاكها اليات مختلفة تعمل على خفض الاجهادات الحيوية وغير الحيوية (Biotic and abiotic stresses) التي من الممكن ان يتعرض لها النبات و انعكاس ذلك ايجابياً في زيادة نسبة انبات البذور و الوزن الجاف للنبات و انخفاض لموت البادرات (Mastouri و آخرون، 2010; Harman و آخرون، 2012). كما بينت دراسات سابقة امكانية التداخل بين العديد أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و منها *T. harzianum* و *T. viride* مع بعض المبيدات الكيميائية و منها المبيد Sancozeb (400 جزء بالمليون) و Curzate (600 جزء بالمليون) و Mancozeb (100 جزء بالمليون)، و الحصول على كفاءة اكبر في منع أو تحجيم فعل العديد من المسببات المرضية (الطويل، 2010; Wedajo، 2015)، في حين أظهرت التراكيز الأعلى منها تثبيطا واضحاً في نمو تلك الأنواع الفطرية.

أتفقت نتائج هذه الدراسة مع ما وجده الاسدي (2020) من امكانية استخدام نفس أنواع الفطر *Trichoderma* spp. التي استخدمت في هذه الدراسة (*T. longibrachaitum* و *T. asperellum* و *T. aspirelloides*) بشكل متداخل مع المبيد الكيميائي Beltanol و اوكسيد المغنيسيوم النانوي في مقاومة الفطر الممرض *F. brachgibbosum*. استغلت نفس هذه الأنواع (*T. longibrachaitum* و *T. asperellum* و *T. aspirelloides*) في دراسة سابقة و بكفاءة عالية مع المبيد Rhizolex في مقاومة تعفن بذور و موت بادرات الخيار المتسبب عن الفطر *R. solani* (فالح، 2020). كما اتفقت هذه النتائج مع ما وجده Salih و آخرون (2019) أن *T. harzianum* له نشاط مثبط و مضاد للفطريات المسببة لمرض تعفن جذور الباميا *R. solani* و *F. solani* و*M. phaseolina*. ويستنتج من نتائج هذه التجربة ان هناك تأثير إيجابي للتكامل بين *T. harzianum* و مبيد الفطريات Topsin M في الحد من مرض تعفن جذور الباميا و زيادة نمو النبات.

جدول (8) تأثير المبيد الكيميائي Topsin M و أنواع الفطر *Tricoderma* spp. و التداخل بينهما في إنبات بذور و نمو بادرات الباميا و الوزن الجاف لها في الاصص البلاستيكية.

المعاملة	% لانبات البذور	% لموت البادرات	الوزن الجاف (غم / بادرة)
تربة غير ملوثة بفطر (مقارنة)	90.00*	0.00	1.03
تربة ملوثة بالفطر الممرض *F. culmorum* فقط (مقارنة)	36.66	52.77	0.072
المبيد Topsin M 0.25 غم/ لتر	90.00	0.00	1.27
أنواع الفطر *Tricoderma* spp.	93.33	0.00	1.35
***F. culmorum* + المبيد Topsin M**	86.66	8.33	1.20
أنواع الفطر *F. culmorum* + *Tricoderma* spp.	83.33	3.70	1.30
المبيد Topsin M + أنواع الفطر *F. culmorum* + *Tricoderma* spp.	96.66	0.00	1.50
$L.S.D_{0.05}$	10.809	1.406	0.296

*كل رقم في الجدول يمثل معدل لثلاث مكررات.



المقارنة بدون اضافة أي فطر	تربة معاملة بالمبيد الكيميائي Topsin M	تربة معاملة بأنواع الفطر *Trichoderma* spp.
تربة معاملة بالفطر الممرض *F. culmorum* فقط	تربة معاملة بالمبيد الكيميائي Topsin M + أنواع الفطر *Tricoderma* spp. + الفطر الممرض *F. culmorum*	تربة معاملة بالمبيد الكيميائي Topsin M + الفطر الممرض *F. culmorum*

شكل (24) تأثير المبيد الكيميائي Topsin M و أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في إنبات بذور نبات الباميا في الاصص البلاستيكية.

4-15تصنيع المبيد الحيوي

4-15-1 تحديد الوسط التخمري الملائم لنمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp.

من اجل تحديد وسط التنمية الأفضل لنمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و3 و4 و5)، اختبرت مجموعة من الأوساط (الخباز و الازولا و كوالح الذرة و سعف النخيل و الثيل و التبن) لاختيار الأفضل منها واستخدامه في تصنيع المبيد الحيوي. بينت النتائج ان وسط الخباز كان الاكثر تفضيلاً من حيث نمو أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و3 و4 و5) بإعطائه أعلى عدد للوحدات تكاثرية بلغت

$10^9 \times 148.26$ وحدة تكاثرية/ مل، تلاها و بفارق غير معنوي وسط الازولا ($10^9 \times 147.86$ وحدة تكاثرية/ مل) و الذي اختلف بفارق معنوي عن عدد الوحدات التكاثرية المتكونة على أوساط التنمية الأخرى (الثيل و التبن) والتي كان اقلها عند تنمية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و3 و4 و5) على التبن و بمعدل عدد وحدات تكاثرية بلغ $10^9 \times 35.66$ وحدة تكاثرية/ مل (جدول 9).

أوضحت النتائج أيضاً ان نوعي الفطر *Trichoderma* spp. (3 و 4) كانت الأعلى تكويناً للوحدات التكاثرية من بين الأنواع الأخرى و بمعدل وصل إلى $10^9 \times 79.60$ و $10^9 \times 77.66$ وحدة تكاثرية/ مل، على التوالي. لم تختلف هاتين النوعين معنوياً عن نوع الفطر *Trichoderma* spp. (5) و الذي بلغ معدل الوحدات التكاثرية له $10^9 \times 73.27$ وحدة تكاثرية/ مل، بينما اختلفت معنوياً عن نوع الفطر *Trichoderma* spp. (2) و التي سجلت اقل عدد للوحدات التكاثرية بلغت $10^9 \times 47.72$. هذا و أثبتت النتائج أيضاً ان تنمية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) معاًعلى نفس الوسط قد أعطى فارقاً معنوياً في عدد الوحدات التكاثرية و بمعدل بلغ $10^9 \times 277.86$ وحدة تكاثرية/ مل (جدول 9). تبين أيضاً ان وسط كوالح الذرة كان الاكثر ملائمة في نمو نوع الفطر *Trichoderma* spp. (3) و بعدد وحدات تكاثرية وصلت إلى $10^9 \times 115.00$ وحدة تكاثرية/ مل و بفارق غير معنوي عن وسط الخباز الذي بلغ $10^9 \times 97.33$ وحدة تكاثرية/ مل، في حين أعطت الأنواع الأخرى معدلات مختلفة تراوحت بين $10^9 \times 31.66$ و $10^9 \times 101.33$ وحدة تكاثرية/ مل عند تنميتها على بقية الأوساط. بينت النتائج أيضاً ان جميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و3 و4 و5) لها القدرة على النمو في جميع الأوساط و بمعدلات متقاربة في عدد الوحدات التكاثرية عن تنميتها بشكل مفرد. كما وجد ان هناك زيادة عالية في عدد الوحدات التكاثرية عند تنمية جميع أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و3 و4 و5) معاً على نفس الوسط و بحوالي ثلاثة أضعاف مما لو تم تنميتها بشكل مفرد.

قد يعود السبب في تفوق نمو و تجرثم بعض الفطريات و منها فطريات المقاومة الإحيائية مثل أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على بعض الأوساط إلى احتوائها على المتطلبات الغذائية للفطر مثل الكاربوهيدرات و الدهون و الفيتامينات (Danielson و Davey، 1973)، Cellulose و اللكنوسليلوز و Pectin أو السكريات الأخرى، و العناصر المعدنية مثل الكادميوم و النيكل و الرصاص و المغنيسيوم و المنغنيز والنحاس و البورون و الزنك و الألمنيوم و الصوديوم، و كفاءتها العالية في استغلال المغذيات و قدرتها العالية على تعديل خصائص الأوساط النامية عليها (Benítez و آخرون، 2004; Harman و آخرون، 2004; Sala و آخرون، 2019).

أشار باحثون في دراسات سابقة قدرة الفطر *Trichoderma* spp. على النمو و التجرثم على أوساط تنمية مختلفة و منها مخلفات الرز و الحنطة و نخالة الذرة. ففي دراسة أجريت من قبل Cavalcante و آخرون (2008) وجدوا ان وسط نخالة الحنطة كان الأفضل مقارنة بمخلفات الرز و

الحنطة و نخالة الذرة في تنمية بعض أنواع الفطر *Trichoderma* spp. كما وجد علوان (2005) ان هناك تفاوتاً واضحاً في نمو و تجرثم الفطر *T. harzianum* على الأوساط المستعملة و المتمثلة بجريش حبوب الذرة الصفراء و الرز والحنطة و بذور زهرة الشمس و نوى التمر.

أثبت الاسدي (2020) و فالح (2020) ان الفطريات *T. atroviride* و *T. longibrachaitum* و *T. asperellum* و *T. aspirelloides* لها القابلية على النمو بكفاءة عالية على مجموعة من الأوساط (سعف النخيل و القصب و زهرة النيل و البردي و الشمبلان و السماد الحيواني) بشكل منفرد و بمعدلات متقاربة. كما لاحظوا ان هناك زيادة معنوية في عدد الوحدات التكاثرية وصلت إلى ثلاثة أضعاف في حالة تنمية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. معا في نفس وسط التنمية مما هو في حالة تنميتها بشكل منفرد. وفقا لما تمخضت به نتائج هذه التجربة، فقد تم اختيار وسط الخباز باعتباره الاكثر ملائمة لتنمية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. من بين الأوساط الأخرى لغرض إكمال خطوات تصنيع المبيد الحيوي.

جدول (9) عدد الوحدات التكاثرية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و 3 و 4 و 5) المتكُونة على أوساط التنمية (خباز و الازولا و كوالح الذرة و سعف النخيل و الثيل و التبن).

المعاملة	عدد الوحدات التكاثري / مل×10^9						
	الخباز	الازولا	كوالح الذرة	سعف النخيل	الثيل	التبن	المعدل
2	*59.00	49.33	48.00	46.00	45.00	39.00	47.72
3	97.33	98.66	115.00	94.00	40.33	32.33	79.60
4	95.66	101.33	94.66	98.67	41.66	34.00	77.66
5	93.33	95.00	80.00	87.33	52.33	31.66	73.27
مختلط	396.00	395.00	392.00	389.00	54.00	41.33	277.88
المعدل	148.26	147.86	145.93	143.00	46.66	35.66	
LSD0.05	لأنواع الفطر 33.746		لأوساط التحميل 30.371		للتداخل 27.403		

*كل رقم في الجدول يمثل معدل لثلاث مكررات.

(2) الفطر *T. atroviride*; (3) الفطر *T. longibrachaitum*; (4) الفطر *T. asperellum*; (5) الفطر *T. aspirelloides*.

4-15-2 تقييم المبيد الحيوي المصنع تحت الخزن في درجة حرارة 4 مْ

لغرض تقييم كفاءة المبيد الحيوي المصنع في هذه الدراسة، استعملت عدة أنواع من مواد التحميل (التالك و كبريتات الكالسيوم و الرمل و الكاؤلين) و بطرائق خزن مختلفة (عبوات بلاستيكية و أكياس بلاستيكية و أكياس ورقية) و تحت درجة حرارة خزن 4 مْ لمدة 180 يوماً تخللتها شهرياً فترات لتقييم عدد الوحدات التكاثرية الحيوية المتبقية على كل مادة حاملة.

اظهرت النتائج ان تحميل أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على مادة التالك كانت الأفضل في إعطاء عدداً للوحدات التكاثرية بلغ (105.96×10^9 وحدة تكاثرية/ مل)، تلتها و بفارق معنوي مادة

التحميل على كبريتات الكالسيوم (95.53 ×10^9 وحدة تكاثرية/ مل) و مادة الكاؤلين (83.44×10^9 وحدة تكاثرية/ مل)، بينما وجد ان اقل معدل لعدد الوحدات التكاثرية (70.44×10^9 وحدة تكاثرية/ مل) كان لتلك المحملة على الرمل (جدول 10).

كما بينت النتائج أيضاً ان تنمية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (2 و3 و4 و5) على وسط الخباز المطحون و المعقم فقط دون تحميلها على أي من مواد التحميل السابقة قد حافظ على حيوية الوحدات التكاثرية بدرجة عالية عند جميع فترات الخزن (0 و 30 و 60 و 90 و 120 و 150 و 180 يوماً) بطرائق التعبئة المختلفة (عبوات بلاستيكية و أكياس بلاستيكية و أكياس ورقية)، إذ بلغ معدل عدد الوحدات التكاثرية عند فترة الخزن 180 يوما" و بطرائق الخزن المختلفة 304.33×10^9 و 263×10^9 و 235.66×10^9 وحدة تكاثرية / مل، على التوالي، مقارنة بعدد الوحدات التكاثرية عند بدء فترة الخزن (0 يوم التي بلغت349.33×10^9. أما بالنسبة إلى طرائق الخزن، فقد أعطت طريقة الخزن باستخدام الأكياس الورقية أعلى المعدلات (139.45×10^9 وحدة تكاثرية / مل)، تلتها و بفارق معنوي طريقتي الخزن باستخدام الأكياس البلاستيكية (128.93×10^9 وحدة تكاثرية/ مل) و العبوات البلاستيكية (115.03×10^9 وحدة تكاثرية/ مل) (جدول 10).

بينت النتائج أيضاً ان عدد الوحدات التكاثرية بلغ 105.15×10^9 وحدة تكاثرية/ مل بعد فترة خزن 180 يوماً مقارنة بعدد الوحدات التكاثرية عند بداية التخزين (0 يوماً) الذي بلغ 169.79×10^9 وحدة تكاثرية/ مل. اما في فترات التخزين الأخرى (30 و 60 و 90 و 120 و 150 يوما) فقد تراوح عدد الوحدات التكاثرية بين 150.17×10^9 - 112.06×10^9 وحدة تكاثرية/ مل (جدول 10). فيما يخص تأثير فترات الخزن، فقد لوحظ ان هناك تناقص في عدد الوحدات التكاثرية مع زيادة فترات الخزن حيث بلغ 169.79× 10^9 وحدة تكاثرية/ مل عند بداية فترة الخزن (0 يوماً) و بفارق معنوي عن باقي الفترات، بينما كان اقلها عند الفترة 180 يوماً و بمعدل بلغ 105.15×10^9 وحدة تكاثرية/ مل، في حين بلغت معدلات الوحدات التكاثرية 150.19× 10^9 و 144.95× 10^9 و 133.10× 10^9 و 121.59×10^9 و 112.06× 10^9 وحدة تكاثرية/ مل عند فترات الخزن 30 و 60 و 90 و 120 و 150 يوماً، على التوالي.

فيما يتعلق بتأثير التداخل بين المواد الحاملة و فترات الخزن، فقد سجلت المادة الحاملة التالك و عند جميع الفترات أعلى المعدلات للوحدات التكاثرية و بفارق معنوي عن باقي المواد الحاملة باستثناء عدد الوحدات التكاثرية المحمولة على وسط المقارنة (الخباز) التي تفوقت في عدد الوحدات التكاثرية و عند جميع الفترات على بقية المواد الحاملة التي تناقص فيها عدد الوحدات التكاثرية مع زيادة فترة الخزن، إذ سجل التداخل (0 يوماً) مع المادة الحاملة التالك عدد وحدات تكاثرية بلغت 146.33×10^9 وحدة تكاثرية/ مل و اقلها كان عند الفترة 180 يوما (46.77× 10^9 وحدة تكاثرية/ مل).

سجل التداخل بين كل من فترات الخزن و طريقة الخزن باستخدام الأكياس الورقية فارقاً معنوياً عن باقي التداخلات و التي كان أفضلها عند الفترة 30 يوماً(162.33×10^9 وحدة تكاثرية/ مل) بينما كان معدل عدد الوحدات التكاثرية اقل عند الفترة 180 يوماًعند الخزن بالعبوات البلاستيكية (97.26×10^9 وحدة تكاثرية / مل). أما بالنسبة لتأثير التداخل بين المادة الحاملة و طريقة الخزن، فقد أظهرت النتائج تفوق التداخل بين مادة التالك و طريقة الخزن باستخدام الأكياس الورقية و بمعدل بلغ 94.28×10^9 وحدة تكاثرية/ مل، في حين وجد ان اقل عدد للوحدات التكاثرية كان عند التداخل بين الرمل و الخزن بالعبوات البلاستيكية و بمعدل بلغ 60.99×10^9 وحدة تكاثرية/ مل. كما اعطى التداخل بين مادة التالك و طريقة الخزن بالأكياس الورقية فارقاً عن باقي التداخلات عند الفترة 30 يوماً وبمعدل بلغ 131.66×10^9 وحدة تكاثرية/ مل فيما عدا معاملة المقارنة، في حين سجل التداخل بين الفترة 180 يوماً و العبوات البلاستيكية و الرمل اقل معدل بلغ 31.33×10^9 وحدة تكاثرية/ مل.

أثبت من خلال النتائج التفوق المعنوي في عدد الوحدات التكاثري الموجودة على وسط الخباز و عند جميع فترات الخزن و باستخدام الأكياس الورقية مقارنة بباقي الأوساط و المواد الحاملة (التالك و الرمل و كبريتات الكالسيوم و الكاؤلين) و طرائق الخزن الاخرى (عبوات بلاستيكية و اكياس بلاستيكية).

جدول (10) عدد الوحدات التكاثرية (وحدة تكاثرية/ مل) لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. في المستحضر المخزون في درجة حرارة 4 مْ.

فترات الخزن (يوم)	طريقة الخزن / المواد الحاملة	أكياس ورقية	أكياس بلاستيكية	عبوات بلاستيكية	تأثير التداخل بين فترة الخزن و المادة الحاملة	تأثير متوسط فترة الخزن
0	المقارنة	349.33	349.33	349.33	349.33	169.79
	التالك	146.33	146.33	146.33	146.33	
	الكاؤلين	123.33	123.33	123.33	123.33	
	كبريتات الكالسيوم	133.00	133.00	133.00	133.00	
	الرمل	97.00	97.00	97.00	97.00	
30	المقارنة	351.00	333.33	245.00	309.77	150.19
	الكاؤلين	111.00	107.33	105.66	107.99	
	التالك	131.66	133.33	125.33	130.10	
	الرمل	94.66	90.00	76.66	87.10	
	كبريتات الكالسيوم	123.33	115.33	109.33	115.99	
60	المقارنة	342.33	320.33	290.33	317.66	144.95
	الكاؤلين	105.33	101.00	92.00	99.44	
	التالك	130.33	122.33	120.33	124.33	
	الرمل	82.66	80.66	72.00	78.44	
	كبريتات الكالسيوم	111.66	99.66	103.33	104.88	
90	المقارنة	338.33	306.33	273.33	305.99	133.10
	الكاؤلين	94.66	96.33	90.00	93.66	
	التالك	110.66	101.33	102.00	104.66	
	الرمل	72.66	72.00	57.66	67.44	
	كبريتات الكالسيوم	97.33	90.66	93.33	93.77	
120	المقارنة	322.00	292.00	249.33	287.77	121.59
	الكاؤلين	92.00	87.33	80.33	86.55	
	التالك	93.33	90.66	82.33	88.77	
	الرمل	70.33	63.33	52.33	61.99	
	كبريتات الكالسيوم	90.66	82.00	76.00	82.88	
150	المقارنة	313.33	273.33	244.33	276.99	112.06
	الكاؤلين	86.66	80.66	68.00	78.44	
	التالك	83.00	78.33	66.00	75.77	
	الرمل	63.33	59.66	40.00	54.33	
	كبريتات الكالسيوم	81.66	73.00	60.66	71.77	
180	المقارنة	304.33	263.00	235.66	267.66	105.15
	الكاؤلين	76.00	71.33	72.00	73.11	
	التالك	75.33	67.67	72.33	71.77	
	الرمل	56.33	52.66	31.33	46.77	
	كبريتات الكالسيوم	77.66	63.00	58.66	66.44	
تأثير متوسط طريقة الخزن		139.45	128.93	115.03		
تأثير التداخل بين فترة الخزن و طريقة الخزن	0	169.79	169.79	169.79	تأثير متوسط المادة الحاملة	
	30	162.33	155.86	132.39		
	60	154.46	144.79	135.59		
	90	142.72	133.33	123.26		
	120	133.66	123.06	108.06		
	150	125.59	112.99	93.66		
	180	117.93	103.53	97.26		
تأثير التداخل بين المادة الحاملة و طريقة الخزن	المقارنة	331.52	305.37	269.61	118.91	
	الكاؤلين	98.42	95.33	90.18	83.44	
	التالك	94.28	105.71	92.66	105.96	
	الرمل	76.71	75.76	60.99	70.44	
	كبريتات الكالسيوم	102.18	93.80	90.61	95.53	
L.S.D0.05						
للفترات =	للمواد الحاملة =	لطريقة الخزن =	لتداخل الفترة و طريقة الخزن =	لتداخل الفترة و المادة الحاملة =	لتداخل الفترة و المادة الحاملة=	التداخل الثلاثي بين الفترات و المادة الحاملة وطريقة الخزن=
2.269	1.999	1.295	5.723	4.169	4.102	9.093

*كل رقم في الجدول يمثل معدل لثلاث مكررات.

3-15-4 تقييم المبيد الحيوي المصنع تحت الخزن في ظروف المختبر

أوضحت نتائج الخزن تحت ظروف المختبر ان تنمية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و تحميلها على مسحوق التالك قد أعطى أعلى معدل لعدد الوحدات التكاثرية (96.77×10^9 وحدة تكاثرية/ مل)، تلتها بفارق معنوي تلك المحملة على كبريتات الكالسيوم (85.47×10^9 وحدة تكاثرية / مل)، بينما كان عدد الوحدات التكاثرية عند التحميل على مسحوق الكاؤلين 81.33×10^9 وحدة تكاثرية/ مل، في حين وجد ان اقل معدل لعدد الوحدات التكاثرية (59.82×10^9 وحدة تكاثرية/ مل) كان عند تحميل أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على مسحوق الرمل (جدول 11). كما بينت النتائج ان تنمية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على مسحوق الخباز و خزنها في ظروف المختبر دون تحميلها على أي من المواد الحاملة (التالك و الكاؤلين و كبريتات الكالسيوم و الرمل) أعطى أعلى المعدلات لعدد الوحدات التكاثرية (262.39×10^9 وحدة تكاثرية/ مل) و بفارق معنوي عن تلك المحملة على مواد التحميل المذكورة اعلاه (جدول 11).

هذا و قد أعطت طريقة الخزن باستخدام الأكياس الورقية أعلى المعدلات في عدد الوحدات التكاثرية (130.18×10^9 وحدة تكاثرية/ مل) و التي اختلفت معنوياً عن عدد الوحدات التكاثرية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. المحملة و المخزونة في أكياس بلاستيكية (119.95×10^9 وحدة تكاثرية/ مل) و العبوات البلاستيكية (114.24×10^9 وحدة تكاثرية/ مل) (جدول 11). اما بالنسبة إلى تأثير فترات الخزن، فقد أثبتت النتائج انخفاض في عدد الوحدات التكاثرية بازدياد فترة الخزن، حيث بلغت 169.79×10^9 وحدة تكاثرية/ مل عند بداية الخزن (0 يوماً) و بفارق معنوي عن باقي فترات الخزن، بينما بلغت اقلها عند الخزن بعد 180 يوماً (73.38×10^9 وحدة تكاثرية/ مل). أعطت بقية الفترات (30 و 60 و 90 و 120 و 150 يوماً) عدد وحدات تكاثرية بلغت 144.40×10^9 و 125.79×10^9 و 113.93×10^9 و 105.87×10^9 و 86.90×10^9 وحدة تكاثرية/ مل، على التوالي.

بينت نتائج تأثير التداخل بين المواد الحاملة و فترات الخزن ان التالك كان من أفضل المواد الحاملة المستخدمة للحفاظ على حيوية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. و عند جميع فترات الخزن حيث وصل عدد الوحدات التكاثرية في التداخل بين الفترة 0 يوماً مع المادة الحاملة التالك 146.33×10^9 وحدة تكاثرية/ مل، بينما وجد ان اقل عدد للوحدات التكاثرية كان (23.00×10^9 وحدة تكاثرية/ مل) عند الفترة 180 يوماً و باستخدام الرمل كمادة حاملة (جدول 11). كما سجل التداخل بين الفترات و طريقة الخزن باستخدام الأكياس الورقية فارقاً معنوياً عن بقية التداخلات بعدد الوحدات التكاثرية التي بلغت 159.27×10^9 وحدة تكاثرية/ مل، في حين وجد ان اقل عدد للوحدات التكاثرية كان عند التداخل بين الفترة 180 يوماً و طريقة الخزن بالعبوات البلاستيكية بمعدل وصل إلى 68.60×10^9 وحدة تكاثرية/ مل.

بينت النتائج أيضاً تفوق التداخل بين المادة الحاملة التالك مع طريقة الخزن باستخدام الأكياس الورقية و بمعدل بلغ $10^9 \times 103.94$ وحدة تكاثرية/ مل، في حين سجل اقل معدل ($10^9 \times 54.28$ وحدة تكاثرية/ مل) عند التداخل بين المادة الحاملة الرمل مع الخزن بالعبوات البلاستيكية. كما أظهرت نتائج التداخل بين المادة الحاملة و فترات و طريقة الخزن تفوق معنوي لمادة التالك و طريقة الخزن بالأكياس الورقية عند فترة الخزن 30 يوماً بمعدل بلغ $10^9 \times 136.66$ وحدة تكاثرية/ مل عن باقي معاملات التداخل. كما اثبتت النتائج أيضاً ان اقل معدل لعدد الوحدات التكاثرية كان عند التداخل بين المادة الحاملة الرمل و العبوات البلاستيكية عند الفترة 180 يوماً ($10^9 \times 23.00$ وحدة تكاثرية / مل).

يستنتج من نتائج هاتين التجربتين (الخزن في درجة حرارة 4 مْ و الخزن في ظروف المختبر) ان أفضل عدد للوحدات التكاثرية تحقق عند تنمية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على وسط الخباز المطحون و المعقم و تحميلها على مادة التالك و تخزينها في أكياس ورقية، إذ أعطت هذه المعاملة حماية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. حتى بعد مرور 180 يوماً من الخزن. كما أثبت النتائج ان تنمية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. على وسط الخباز و تخزينه بدون التحميل على أي من المواد الحاملة (التالك و الكاؤلين و كبريتات الكالسيوم و الرمل) كان الأفضل في المحافظة على حيوية أنواع الفطر مقارنة بتحميلها على المواد المذكورة اعلاه مما يشجع استخدام وسط الخباز المطحون و المعقم في تنمية أنواع الفطر *Trichoderma* spp. للاستخدام المباشر أو للتخزين بعد التحضير و خصوصاً أن نبات الخباز متوفر بكثرة في موسم نموه و قلة تكاليف الحصول عليه، اضافة إلى كونه مادة عضوية تتحلل و يستفاد منها النبات في التغذية بعد الإضافة إلى التربة من خلال تحسين خواص التربة اضافة إلى فائدته في تشجيع نمو بعض الأحياء المجهرية المفيدة للنبات و منها الفطريات المستخدمة في المقاومة الاحيائية لمسببات أمراض النبات.

كما ان المحافظة الملحوظة في عدد الوحدات التكاثرية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. عند تخزينها في الأكياس الورقية مقارنة بطرائق الخزن الأخرى قد يعود إلى مسامية الأكياس الورقية التي تساعد على نفاذ الأوكسجين و توفير مدى معتدل من الرطوبة و درجات الحرارة اللازمة للحفاظ على حيوية السبورات الفطرية خلال فترة الخزن مقارنة بطريقة الخزن باستخدام العبوات البلاستيكية التي سجلت اقل عدداً للوحدات التكاثرية لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. و ذلك لكون مادة البلاستك غير نفاذة للهواء و تساعد على تهيئة ظروف غير مناسبة من الحرارة و الرطوبة و التي تؤثر سلباً على حيوية السبورات الفطرية. كما أن للمواد الحاملة دوراً أساسيا في المحافظة على حيوية الوحدات التكاثرية للفطر خلال فترة التخزين عند تعرضها للظروف غير الملائمة كارتفاع درجة الحرارة و قلة الرطوبة (Jeyarajan و Nikkeeran، 1996).

اتفقت هذه النتائج مع ما توصلت اليه Karunanithi و آخرون (2001) إلى امكانية تحميل الفطر *T. viride* على مادة كاربونات الكالسيوم و التالك و الاحتفاظ بحيويته لمدة 150 يوماً من الخزن في درجة حرارة الغرفة. و في دراسة اخرى أجريت من قبل Kumar (2013) وجد ان عدد الوحدات التكاثرية للفطر *T. viride* المحمل على مادة الفحم و التالك معاً قد انخفض من $10^9 \times 227.20$ إلى $10^9 \times 70.33$ وحدة تكاثرية/ مل بعد مرور 120 يوماً من الخزن. كما اتفقت هذه النتائج مع الاسدي (2020) و فالح (2020) الذي وجدوا ان وسط سعف النخيل و زهرة النيل المطحونين و المعقمين كانا الاكثر تفضيلاًمن بين أوساط اخرى مثل البردي و القصب و الشمبلان و السماد الحيواني في نمو أنواع مختلفة من الفطر *Trichoderma* spp. (*T. atroviride* و *T. longibrachaitum* و *T. asperellum* و *T. aspirelloides*) و بعدد وحدات تكاثرية بلغ 326×10^9 و 285×10^9 و 312×10^9 و 325×10^9 وحدة تكاثرية/ مل، على التوالي عند استخدامهما بدون التحميل على أي من المواد الحاملة (التالك و الكاؤلين و كبريتات الكالسيوم و الرمل). كما وجدوا ان أنواع الفطر احتفظت بقدرتها الحيوية حتى بعد مرور 150 يوماً من الخزن تحت ظروف المختبر و كذلك الخزن في درجة حرارة 4 ْم عند تحميلها على وسط التالك و الخزن بالأكياس الورقية.

جدول (11) عدد الوحدات التكاثرية (وحدة تكاثرية/ مل) لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. في المستحضر المخزون في ظروف المختبر.

فترات الخزن (يوم)	طريقة الخزن / المواد الحاملة	أكياس ورقية	أكياس بلاستيكية	عبوات بلاستيكية	تأثير التداخل بين فترة الخزن و المادة الحاملة	تأثير متوسط فترة الخزن
0	المقارنة	349.33*	349.33	349.33	349.33	169.79
	التالك	146.33	146.33	146.33	146.33	
	الكاؤلين	123.33	123.33	123.33	123.33	
	كبريتات الكالسيوم	133.00	133.00	133.00	133.00	
	الرمل	97.00	97.00	97.00	97.00	
30	المقارنة	343.66	285.33	264.33	297.77	144.40
	الكاؤلين	107.73	102.33	90.66	100.24	
	التالك	136.66	130.33	113.33	126.77	
	الرمل	85.33	79.66	75.33	80.10	
	كبريتات الكالسيوم	123.00	113.33	115.00	117.11	
60	المقارنة	291.33	257.73	241.33	263.46	125.79
	الكاؤلين	95.46	86.33	79.83	87.20	
	التالك	110.33	109.33	106.33	108.66	
	الرمل	73.00	70.66	59.00	67.55	
	كبريتات الكالسيوم	103.33	93.33	109.66	102.10	
90	المقارنة	297.33	220.33	222.33	246.66	113.93
	الكاؤلين	93.00	81.23	72.33	82.18	
	التالك	104.33	92.33	81.33	92.66	
	الرمل	64.33	60.33	49.33	57.99	
	كبريتات الكالسيوم	101.33	79.33	89.83	90.16	
120	المقارنة	290.66	223.33	212.33	242.10	105.87
	الكاؤلين	81.33	71.66	66.00	72.99	
	التالك	89.66	83.33	72.33	81.77	
	الرمل	62.00	59.33	46.33	55.88	
	كبريتات الكالسيوم	82.88	74.00	73.00	79.66	
150	المقارنة	273.33	230.00	198.33	233.88	86.90
	الكاؤلين	59.32	59.00	49.67	72.99	
	التالك	73.60	67.33	59.67	81.77	
	الرمل	36.66	35.00	30.00	55.88	
	كبريتات الكالسيوم	53.00	39.67	39.00	78.66	
180	المقارنة	198.66	212.00	200.00	203.55	73.38
	الكاؤلين	45.82	53.00	43.00	63.93	
	التالك	66.67	52.33	44.00	54.33	
	الرمل	28.67	27.33	23.00	39.89	
	كبريتات الكالسيوم	38.33	35.00	33.00	62.85	
تأثير متوسط طريقة الخزن		130.18	119.95	114.24		
تأثير التداخل بين فترة الخزن و طريقة الخزن	0	169.79	169.79	169.79	تأثير متوسط المادة الحاملة	
	30	159.27	142.19	131.73		
	60	134.69	123.47	119.23		
	90	132.06	106.71	103.03		
	120	121.30	102.33	93.99		
	150	99.18	86.20	75.33		
	180	75.63	75.93	68.60		
تأثير التداخل بين المادة الحاملة و طريقة الخزن	المقارنة	292.04	254.00	241.14	262.39	
	الكاؤلين	87.04	82.41	74.97	81.33	
	التالك	103.94	97.33	89.04	96.77	
	الرمل	63.85	61.33	54.28	59.82	
	كبريتات الكالسيوم	90.69	81.09	84.64	85.47	

L.S.D0.05

للفترات =	للمواد الحاملة =	لطريقة الخزن =	للتداخل و طريقة الخزن =	للتداخل الفترة و المادة الحاملة =	للتداخل الفترة و المادة الحاملة=	التداخل الثلاثي بين الفترات و المادة الحاملة وطريقة الخزن=
1.203	1.986	1.254	3.671	3.675	1.803	5.672

*كل رقم في الجدول يمثل معدل لثلاث مكررات.

5- الاستنتاجات و التوصيات

5-1 الاستنتاجات:

1- أظهرت نتائج العزل و التشخيص ان عزلة الفطر *F. culmorum* من بين العزلات الاخرى (15 عزلة) كانت الاكثر امراضية.
2- وجد ان لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. قدرة تضادية فيما بين الفطر *T. harzianum* و الفطر *T. longibrachaitum* و الفطر *T. asperellum* و لم يكن هنالك قدرة تضادية بينها و بين الفطر *T. atroviride* و الفطر *T. aspirelloides* عند اختبارها على وسط البطاطا دكستروز اكر (PDA) في أطباق بتري.
3- أظهرت النتائج ان لإضافة رواشح أنواع الفطر *Trichoderma* spp. بتركيز 80% و 100% دوراً في زيادة نسبة الانبات و الوزن الجاف لبذور و بادرات نبات الباميا و الذرة الصفراء و الفجل.
4- وجد ان لتلويث التربة بأنواع الفطر *Trichoderma* spp. (*T. longibrachaitum* و *T. asperellum* و *T. atroviride* و *T. aspirelloides*) دوراً معنوياً في زيادة محتوى نبات الباميا من العناصر المعدنية النتروجين و الفسفور و البوتاسيوم.
5- كفاءة المبيد الكيميائي Topsin M بتركيز 0.25 غم/ لتر في تثبيط الفطر الممرض *F. culmorum* و الذي كان اقل تأثيراً على أنواع الفطر *Trichoderma* spp.
6- وجد ان استخدام أنواع الفطر *Trichoderma* spp. (*T. longibrachaitum* و *T. asperellum* و *T. atroviride* و *T. aspirelloides*) في تثبيط الفطر الممرض *F. culmorum* كان له اثراً في زيادة انزيم (Peroxidase) و (Catalase) كما كان له اثراً في زيادة هرمون الجبرلين (AG3) و خفض هرمون الابسسك اسد (ABA).
7- تفوق معاملة المبيد الحيوي لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. و المبيد الكيميائي Topsin M على بقية المعاملات في مقاومة الفطر الممرض *F. culmorum* و رفع نسبة الانبات لبذور نبات الباميا و كذلك زيادة الوزن الجاف لبادرات نبات الباميا.
8- تبين ان استخدام وسط الخباز المطحون و المعقم و المضاف اليه الحديد (FeEDTA) (بتركيز 0.75 غم/ لتر مادة تجارية) كوسط تخمري لتنمية أنواع الفطر *Trichoderma* spp.، فقد اعطى هذا الوسط تفوقاً في عدد الوحدات التكاثرية مقارنة بالوحدات التكاثرية التي لوحظت على بقية الاوساط الاخرى (الازولا و كوالح الذرة و سعف النخيل و الثيل و التبن).
9- وجد ان أفضل طريقة تحميل و خزن أنواع الفطر *Trichoderma* spp. كانت على المادة الحاملة التالك و تخزينه بالأكياس الورقية في درجة حرارة 4 مْ و كذلك في ظروف المختبر من بين المعاملات الاخرى حتى بعد مرور 180 يوماً من الخزن.

5-2 التوصيات

1- إجراء المزيد من الدراسات حول الفطر الممرض *F. culmorum* و تأثيره على بعض العوائل النباتية الاخرى و معرفة السموم التي ينتجها و تأثيرها على صحة الانسان و الحيوان.
2- استغلال أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في هذه الدراسة في المكافحة الحيوية كبدائل للمبيدات الكيميائية، حيث اثبتت كفاءتها العالية في مقاومة الفطر الممرض *F. culmorum*.

3- امكانية استخدام المبيد الكيميائي Topsin M بتركيز (0.25 غم / لتر) في مكافحة نمو الفطر الممرض *F. culmorum* و بالتكامل مع أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المستخدمة في هذه الدراسة.

4- عمل تقييم حقلي لمستحضر المبيد الحيوي المصنع في هذه الدراسة لمعرفة افضل المعاملات من حيث تلويث البذور أو إضافته للتربة قبل الزراعة لغرض حماية البذور و البادرات من الاصابة الفطرية.

6- المصادر

6-1 المصادر العربية

الاسدي، علي عبد علي عودة (2020). التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. و انتاج مبيد حيوي منها و اختبار تأثيره في مكافحة الفطر *Fusarium brachygibbosum* المسبب لتعفن البذور وموت بادرات الطماطة (*Solanum lycopersicom* L.). رسالة ماجستير كلية الزراعة، جامعة كربلاء.

الحديثي، بهاء عبد الجبار (2002). النشاط الانزيمي للفطر *Trichoderma harzianum* في التربة و نمو حاصل نبات الطماطة. اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة جامعة بغداد.

الركابي، فاخر وعبد الجبار، ابراهيم و مشعل، جاسم (1984). انتاج الخضر لطلبة المعاهد الزراعية الفنية، مطبعة الاديب، بغداد.

الراوي، خاشع محمود وعبد العزيز، محمد خلف الله (2000). تصميم و تحليل التجارب الزراعية. كلية الزراعة.

الزيادي، صبا عبد الامير كاظم (2011). تقييم كفاءة بعض المستخلصات النباتية و الراشح الزرعي لبعض الفطريات في السيطرة الحيوية لنمو بعض الفطريات المرافقة لبذور نباتي الطماطة و الباميا. رسالة ماجستير كلية العلوم جامعة القادسية.

الصحاف، فاضل حسين (1989). تغذية النبات التطبيقي. دار الحكمة-بغداد.

الطويل، محمد وديما زيني (2010). دراسة مختبرية لتقييم تاثير بعض المبيدات الفطرية في نمو الفطر *Tricoderma* spp. مجلة جامعة تشرين للبحوث و الدراسات العلمية، 1:32.

العامري، هديل احمد و داؤد، زهير عز الدين و عبد، فاتن نوري ملا (2018). تأثير الاصابات الفطرية ومكافحتها في الهرمونات النباتية لصنفي الشيليك Hapil و Fastivi . مجلة علوم الرافدين، 27 (1): 193- 213.

الكعبي، عقيل نزال (2004). دراسة تطور و مكافحة مرض اللفحة المبكرة المتسبب عن الفطر *Alternaria solina* (Ellis and Martin Jones &Grout) على الطماطة في محافظة النجف. رسالة ماجستير- كلية الزراعة جامعة الكوفة.

الناصري، مصطفى، و قيس كاظم (2017). استخدام بعض الطرق الكيميائية والحيوية و التكامل بينها في مقاومة موت وسقوط البادرات على محصول الطماطة المتسبب عن فطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersci* مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية، 17(3): ص256– 268.

بربر، عقيل نزال و الموسوي، محسن عبد علي و الشجيري، كريم عبد الحسين و الغزالي، نور علي (2016). كفاءة الفطر Rifia *Trichoderma harzianum* و بعض العناصر المغذية في حماية بذور و نباتات بعض اصناف الطماطة من الاصابة بالفطريات *F. oxysporium* f .sp. *lycopersicum* (sacc.) snyder و *Rhizoctonia solani*. مجلة جامعة كربلاء، 14(1): ص 60 -49

ديوان، مجيد متعب و كمال الدين، زاهد نوري (2009). تأثير راشحي الفطرين *Aspergillusniger* و *Trichoderma harzianum* و خليطهما في حيوية الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* و في نمو بادرات الطماطة. مجلة الكوفة للعلوم الزراعية،1 (1).

صقر، محب طه (2019). كتاب فسيولوجيا الاجهاد . Stress Physiology كلية الزراعة ـ جامعة المنصورة.

صقر، محب طه (2021). كتاب الهرمونات النباتية. كلية الزراعة ـ جامعة المنصورة.

علوان، صباح لطيف (2005). امكانية تصنيع مبيد احيائي من الفطر*Trichoderma harzianum* لمكافحة مرض تعفن البذور و موت البادرات في الحنطة. اطروحة دكتوراه، جامعة الكوفة.

فالح، جنان علي (2020). استخدام بعض أنواع الفطر .*Trichoderma* spp و الجسيمات النانوية و بعض التراكيب الوراثية في مقاومة مسبب مرض تعفن البذور و موت بادرات الخيار (*Cucumis sativus* L.). جامعة كربلاء/ كلية الزراعة/ قسم وقاية النبات.

نهال، يونس محمد آل مراد (2011). قدرة بعض عزلات الفطر .*Trichoderma* spp على إنتاج إنزيم السيليوليز و دوره في استحثاث المقاومة للفطر *Macrophomina phaseolina* مجلة علوم الرافدين، 59-46 :22.

2-6 المصادر الاجنبية

Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265-267.

Aebi,H.(1974). catalase In :Methods of enzymatic analysis volume2,PP.673-684.

Afzal, S. A. I. M. A., Tariq, S., Sultana, V., Ara, J., & Ehteshamul-Haque, S. (2013). Managing the root diseases of okra with endo-root plant growth promoting *Pseudomonas* and *Trichoderma viride* associated with healthy okra roots. *Pakistan Journal of Botany*, 45(4), 1455-1460.

Akrami, M., & Yousefi, Z. (2015). Biological control of fusarium wilt of tomato (*Solanum lycopersicum*) by *Trichoderma* spp. as antagonist fungi. *In Biological Forum ,Satya Prakashan*. (Vol. 7, No. 1, pp. 887-892).

Al-Abedy, A. N., Al-Fadhal, F. A., Karem, M. H., Al–Masoudi, Z., & Al-Mamoori, S. A. (2018). Genetic variability of different isolates of *Rhizoctonia solani* Kühn isolated from Iranian imported potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *International Journal of Agricultural Statatistic Science*, 14, 587-598.

Al-Fadhal, F. A., AL-Abedy, A. N., & Al-Janabi, M. M. (2018). Molecular identification of novel isolates of *Rhizoctonia solani* Kühn and *Fusarium* spp. (Matsushima) isolated from petunia plants (*Petunia hybrida* L.). *Plant Archives*, 18(1), 703-711.

Alhussaini, M. S., Alghonaim, M. I., Al-Ghanayem, A. A., Al-Yahya, A. A. I., Hefny, H. M., & Saadabi, A. M. (2016). Characterization of *Cladosporium* species by Internal transcribed spacer-PCR and

microsatellites-PCR. *Pakistan journal of biological sciences*, PJBS, 19(4), 143-157.

Ali, A., Haider, M. S., Ashfaq, M., & Hanif, S. (2014). Effect of culture filtrates of *Trichoderma* spp. on seed germination and seedling growth in chickpea–an in-vitro study. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 26(1), 01-05.

Al-Khafagi, H. A. (2012). Chemical control of cowpea damping off and root rot. *Mesopotamia Journal of Agriculture*, 40(1), 249-257.

AL-Musawi, M. A. (2012). Identification of the causes of root and stem baserot diseas of beans and resistance it using of some chemical and biological induction agents master thesis. *Faculty of Agriculture. Baghdad University*. 99 pp.

Al-Sanae, E.A.M., Afaf, I., Shehata, A.H., Mohammed, A.& Amal, A.A.(2016). Molecular detection and characterization of *Fusarium sporotrichioides* based on ITS2 rDNA. *Polymorphism Human Journals*, 2(3): 365-376.

Al-Sharmani, H. R., Al-Kalabi, H. H., & AL-Abedy, A. N. (2019). Efficacy of rice husks compost and *Trichoderma harzianum* on *Rhizoctonia solani* and its effect on seeds germination and seedling health. In IOP conference Series: *Earth and Environmental Science IOP Publishing*. 388(1), 1200-1220.

Anitha, K. R., & Nandihalli, B. S. (2008). Seasonal incidence of sucking pests in okra ecosystem. *Karnataka journal of Agricultural sciences*, 21(1), 137-138.

Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*., 55, 373-399.

Appiah, A. S., Amiteye, S., Boateng, F., & Amoatey, H. M. (2020). Evaluation of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) cultivars for resistance to okra mosaic virus and okra yellow vein mosaic virus. *Australasian Plant Pathology*, 49(5), 541-550.

Arif M.; C. Shilpi; N.W. Zaidi; J.K. Rayar; M. Variar and U.S. Singh. (2012). Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1α) gene. *African Journal of Biotechnology*, 11(2): 444-447.

Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology*, 50(1), 601-639.

Asran-Amal, A., Abd-Elsalam, K. A., Omar, M. R., & Aly, A. A. (2005). Antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against *Rhizoctonia solani* and use of M13 microsatellite-primed PCR to evaluate the antagonist genetic variation. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 112(6), 550-561.

Azarmi, R., Hajieghrari, B., & Giglou, A. (2011). Effect of *Trichoderma isolates* on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *African Journal of Biotechnology*, 10(31), 5850-5855.

Begum, M., Lokesh, S., & Kumar, T. V. (2005). Pathogenicity of Macrophomina phaseolina and *Fusarium verticilloides* in Okra. *Integrative Biosciences*, 9(1), 37-40.

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Mecanismos de biocontrol de cepas de *Trichoderma*. *International Microbiology*, 7(4), 249-260.

Bhaduri, D., Rakshit, R., & Chakraborty, K. (2014). Primary and secondary nutrients-a boon to defense system against plant diseases. *International Journal of Bio-resource and Stress Management*, 5(3), 461-466.

Bhattacharya, R., krishna Koramutla, M., Negi, M., Pearce, G., & Ryan, C. A. (2013). Hydroxyproline-rich glycopeptide signals in potato elicit signaling associated with defense against insects and pathogens. *Plant science*, 207, 88-97.

Bolkan, H. A., & Butler, E. E. (1974). Studies on *heterokaryosis* and virulence of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 64(5), 13-522.

Bonhert, C. (2008). Vegetable Guide . Gefferson Institute. *University of Missouri*, U.S.A.

Bürger, M., & Chory, J. (2019). Stressed out about hormones: how plants orchestrate immunity. *Cell host & microbe*, 26(2), 163-172.

Butt, A. R., Yaseen, S. I., & Javaid, A. (2011). Seed-borne mycoflora of stored rice grains and its chemical control. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 21(2), 193-196.

Cairns, T. C., Nai, C., & Meyer, V. (2018). How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal biology and biotechnology*, 5(1), 1-14.

Cavalcante, R. S., Lima, H. L., Pinto, G. A., Gava, C. A., & Rodrigues, S. (2008). Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 100-104.

Chandra, S.N.; A.C.U. Shankar; S.R. Niranjana and H.S. Prakash. (2008). Molecular detection and characterization of *Fusarium verticillioides* in maize (*Zea mays* L.) grown in southern India. *Annals of Microbiology*, 58 (3): 359-367.

Chandran, S. A., Packialakshmi, R. M., Subhalakshmi, K., Prakash, C., Poovannan, K., Prabu, A. N., ... & Usha, R. (2013). First report of an alphasatellite associated with Okra enation leaf curl virus. *Virus genes*, 46(3), 585-587.

Chaverri, P., Samuels, G. J., & Stewart, E. L. (2001). Hypocrea virens sp. nov.، the teleomorph of *Trichoderma virens*. *Mycologia*، 93(6)، 1113-1124.

Chekali, S., Gargouri, S., Berraies, S., Gharbi, M. 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(2), 75-86.

Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(2), 192-208.

Chen, M., Arato, M., Borghi, L., Nouri, E., & Reinhardt, D. (2018). Beneficial services of *arbuscular mycorrhizal* fungi–from ecology to application. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1270.

Chet, I., & Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Applied biochemistry and biotechnology*, 48(1), 37-43.

Christopher, D. J., Raj, T. S., Rani, S. U., & Udhayakumar, R. (2010). Role of defense enzymes activity in tomato as induced by *Trichoderma virens* against Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum f sp. lycopersici*. *Journal of Biopesticides*, 3(1), 158-167.

Chu, K. H., Li, C. P., & Qi, J. (2006). Ribosomal RNA as molecular barcodes: a simple correlation analysis without sequence alignment. *Bioinformatics*, 22(14), 1690-1701.

Clark, F. E. (1965). Agar-plate method for total microbial count. Methods of Soil Analysis: Part 2 *Chemical and Microbiological Properties*, 9, 1460-1466.

Conrad, C. C., Gilroyed, B. H., McAllister, T. A.,& Reuter, T. (2012). Synthesis of Osero group specific positive controls and real-time PCR standards for nine clinically relevant non-0157 STECs. *Journal of microbiological methods*, 91(1), 52-56002E.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. *Plant physiology*, 149(3), 1579-1592.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Vergara, A. G., & López-Bucio, J. (2015). *Trichoderma* modulates stomatal aperture and leaf transpiration through an abscisic acid-dependent mechanism in Arabidopsis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(2), 425-432.

Contreras-Cornejo; H. A., Macías-Rodríguez, L.; del- Val, E., and Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interaction with plants. FEMS *microbiology ecology*, 92(4), fiw036.

Cook, R. J. (1980).Fusarium foot rot of wheat and its control in the Pacific Northwest. *Plant Dis*, 64(12), 1061-1066.

Cuypers, A., Karen, S., Jos, R., Kelly, O., Els, K., Tony, R., ... & Jaco, V. (2011). The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in Arabidopsis thaliana seedlings. *Journal of plant physiology*, 168(4), 309-316.

Danielson, R. M., & Davey, C. B. (1973). The abundance of *Trichoderma propagules* and the distribution of species in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 5(5), 485-494.

Datnoff, L. E.; and Pernezy, K. L. (2000). Effect of Bacterial and Fungal Microorganisms to colonize Tomato Roots, Implove transplant Growth and control *Fusarium* Crown and Root Rot. *Journal of Kerbala for Agricultural Sciences*, 5(2), 134-148, 485-494.

De la Cruz Quiroz, R., Roussos, S., Hernández, D., Rodríguez, R., Castillo, F., & Aguilar, C. N. (2015). Challenges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-state fermentation: filamentous fungi as a model. *Critical reviews in biotechnology*, 35(3), 326-333.

De las Mercedes Dana, M., Limón, M. C., Mejías, R., Mach, R. L., Benítez, T., Pintor-Toro, J. A., & Kubicek, C. P. (2001). Regulation of chitinase 33 (chit33) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Current genetics*, 38(6), 335-342.

Desvani، S. D., Lestari, I. B., Wibowo, H. R., Supyani, Poromarto, S. H., & Hadiwiyono. (2018). Morphological characteristics and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates collected from some rice production areas in some districts of Central Java. In *AIP Conference Proceedings*. *AIP Publishing LLC*, (Vol. 2014, No. 1, p. 020068).

Dewan, M.M. (1989). Identity and frequency occurrence of fungi in roots of wheat and iye grassand their effect on take-all and host growth. Ph.D. thesis. *Univ. of Western Australia*. pp.201.

Dewan, M.M. (1994). The density number of pathogenic and non-pathogenic fungi associated with tomato roots. *Al-Basrah Agri. J. Science*, 7 (2), 91-100.

Dias, D. A.; Urban, S.; and Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drugdiscovery. *Metabolites*, 2(2), 303-336.

Dilruba S., Hasanuzzaman M., Karim R., Nahar K.. (2009). Yield response of okra to different sowing time and application of growth hormones. *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants (JHSOP)* 1: 10-14.

Dluzniewska D. E. (2008). Systems genetics of mineral metabolism. *Journal of Nutrition* 141: 520-525.

Elad ,Y., Freeman, S. & Monte, E. (2000). Biocontrol agents: Mode of action and interaction with other means of control. *International Organisation for Biological Control*, vol 24. Sevilla, Españ. *Outlooks on Pest Management*, 15(4), 185.

Elizabeth, A.C.; Duncan R.S.; Martha A.T..(2003). Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 62(6) : Pages 355-367.

El-Katatny, M., Gudelj, M., Robra, K. H., Elnaghy, M., & Gübitz, G. (2001). Characterization of a chitinase and an endo-β-1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen Sclerotium rolfsii. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1), 137-143.

Ellis, D. H., Davis, S., Alexiou, H., Handke, R., & Bartley, R. (2007). Descriptions of medical fungi (Vol. 2). Adelaide: *University of Adelaide*.

Elsharkawy, M. M., Shimizu, M., Takahashi, H., Ozaki, K., and Hyakumachi, M. (2013). Induction of systemic resistance against Cucumber mosaic virus in Arabidopsis thaliana by *Trichoderma asperellum* Skt-1. *The plant pathology journal*, 29(2), 193.

Ergon, R. (2002). PLS score–loading correspondence and a bi-orthogonal factorization. *Journal of the Chemometrics Society*, 16(7), 368-373.

FAOSTAT Database .(2004). okra world production statistics http:///www.fao.org/faostat/en/#data/QCL.

FAOSTAT Database .(2019). okra world production statistics http:///www.fao.org/faostat/en/#data/QCL.

Fiedler, Ż., & Sosnowska, D. (2007). Nematophagous fungus Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson is also a biological agent for control of greenhouse insects and mite pests. *BioControl*, 52(4), 547-558.

Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. L., and Rock, C. D. 2002. Abscisic acid. signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14:S15-S45.

Finkelstein, R. R., Gampala, S. S., & Rock, C. D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell*, 14(suppl-1), S15-S45.

Gemede, H. F., Ratta, N., Haki, G. D., Woldegiorgis, A. Z., & Beyene, F. (2015). Nutritional quality and health benefits of okra (*Abelmoschus esculentus*): *Journal of Food Processing & Technology*, 6(2), 458 -466.

Gomes-Silva, F., ALMEIDA, C., Silva, A. G., Leão, M. P., Silva, K. P., Oliveira, L. G., ... & LIMA, V. (2017). Genetic diversity of isolates of *Macrophomina phaseolina* associated with cowpea from Brazil semi-arid region. *Journal of Agricultural Science*, 9(11).

Goodsell, D.S., (2004). Catalase. Molecule of the Month. *Biological Macromolecular Structures Enabling Breakthroughs in Research and Education.* 13(5), 100-120

Haggag, H. E; and El-Gamal N. G. (2012). In vitro study on *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* isolates causing the dampiny off and root rot disease in tomatoes. *Nature and Sci*. 10(11): 16-25.

Halifu, S., Deng, X., Song, X., & Song, R. (2019). Effects of two *Trichoderma* strains on plant growth, rhizosphere soil nutrients, and fungal community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica annual seedlings Forests*, 10(9), 758.

Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzinum* T-22. *Plant disease*, 84(4), 377-393.

Harman, G. E., Herrera-Estrella, A. H., Horwitz, B. A., & Lorito, M. (2012). *Trichoderma* from basic biology to biotechnology. *Microbiology*, 158(1), 1-2.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.

Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C., & Pegler, D. N. (1996). Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, 38, 272-272.

Hayamanesh, S. (2018). The effect of high temperature on physiological and metabolic parameters and reproductive tissues of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). A thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy /University of Sydney/ Sydney Institute of Agriculture School of Life and Environmental Sciences Faculty of Science.

Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. T., Diaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E., & Garcia-Acha, I. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1890-1898.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158(1), 17-25.

Herrera-Téllez, V. I., Cruz-Olmedo, A. K., Plasencia, J., Gavilanes-Ruíz, M., Arce-Cervantes, O., Hernández-León, S., & Saucedo-García, M. (2019). The protective effect of *Trichoderma asperellum* on tomato plants against *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea* diseases involves inhibition of reactive oxygen species production. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 2007.

Hey, J. (2001). Genes, categories, and species: The evolutionary and cognitive cause of the species problem. *Oxford University Press*.

Hossain, G. K., Ahsan, S. M., & Ahmed, T. (2015). Management of seed borne fungal pathogens of okra collected from seed companies. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 1(3), 628-640.

Howard, G.W; and Matindi, S.W. (2003). Alien Invasive Species in Africa's Wetlands. Somethreats and solutions. IUCN Eastern African Regional Program, Nairobi, Kenya, February.

Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1), 4-10.

Howell, C. R., Hanson, L. E., Stipanovic, R. D., & Puckhaber, L. S. (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90(3), 248-252.

Hsuan, H.M.; S. Baharuddin and Z. Latiffah. (2011). Molecular Identification of *Fusarium* Species in *Gibberella fujikuroi* Species Complex from Rice, Sugarcane and Maize from Peninsular Malaysia. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 6722-6732.

Hu, M. J., Grabke, A., Dowling, M. E., Holstein, H. J., & Schnabel, G. (2015). Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin. *Plant Disease,* 99(6), 806-814.

Huang, A.; Z.Q. Li; X.W. Wang; M. Jin. 2016. High-throughput identification of clinical pathogenic fungi by hybridization to an oligonucleotide microarray. *Journal Clinic Microbiology*, 44:3299-3305.

Imran, A., Arif, M., Shah, Z., & Bari, A. (2020). Soil application of *Trichoderma* and peach (*Prunus persica* L.) residues possesses biocontrol potential for weeds and enhances growth and profitability of soybean (Glycine max). *Sarhad Journal of Agriculture*, 36(1), 10-20.

Jacobsen BJ.(2006). Biological control of plant disease by phyllosphere applied biological controlagents. In: Baily M, agents. In: Baily M, editor. *Phyll. Microbiology. London: CRC Press*;. pp. 135-149.

Jain, A., & Goswami, B. K. (2002). Effect of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, alone and together, on NPK of roots and shoots and chlorophyll contents of tomato. *Indian Journal of Nematology*, 32(2), 158-160.

Jenkins, N. E., Heviefo, G., Langewald, J., Cherry, A. J., & Lomer, C. J. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*, 19, 21N-32N.

Jeyarajan, R.; and Nakkeeran, S. (1996). Exploitation of biocontrol potential of *Trichoderma* for field use, In Recent developments in biocontrol of plant pathogens. KM Rao and M Mahadevan, eds. *Today and Tomorrows Printers and Publishers, New Delhi*. 32(3) 61-66.

Jin, B., Zepf, F., Bai, Z., Gao, B., & Zhu, N. (2016). A biotech-systematic approach to select fungi for bioconversion of winery biomass wastes to nutrient-rich feed. *Process Safety and Environmental Protection*, 103, 60-68.

Johanne, C.; Lucie, L.; and Pierre, O. et Richard, RB (2002). Utilisationd'unesoucheindigène de *Trichoderma harzianum* contrecinq agents pathogènes chezle concombre et la tomate de serre au Québec.

John, R. P., Tyagi, R. D., Prévost, D., Brar, S. K., Pouleur, S., & Surampalli, R. Y. (2010). Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum f. sp. adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop protection*, 29(12), 1452-1459.

Jones, J. I.; (1984). In Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Ed. Williams, S. Association of official analytical Chemists. *Arlington, Virginia*. USA. pp. 38- 64.

Kammoun, L. G., Gargouri, S., Barreau, C., Richard-Forget, F., & Hajlaoui, M. R. (2010). *Trichothecene chemotypes* of *Fusarium culmorum* infecting wheat in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*, 140(1), 84-89.

Kapadiya, I. B., Undhad, S. V., Talaviya, J. R., & Siddhapara, M. R. (2014). Evaluation of *phytoextracts* against *Fusarium solani* causing root rot of okra. *Journal of Biopesticides*, 7(7), 7-9.

Karunanithi, k.; Muthusamy, M. and Seetharaman, K. (2001). Gypsum – Asuitable materialfor the mass multiplication of *Trichoderma viride* . *Jeopical Agricultural Research and Extension* 4(2): 115-116.

Kaur, K., Pathak, M., Kaur, S., Pathak, D., & Chawla, N. (2013). Assessment of morphological and molecular diversity among okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.] germplasm. *African Journal of Biotechnology*, 12(21).

Kendall, C. W., & Jenkins, D. J. (2004). A dietary portfolio: maximal reduction of low-density lipoprotein cholesterol with diet. *Current atherosclerosis reports*, 6(6), 492-498.

Khemir, E., Chekali S., Souissi A., Gharbi M.S.. (2018). Survival of *Fusarium culmorum*, causal agent of foot and root rot of cereals, on wheat, barley and oat residues in Tunisia. *Annales de L'INRAT* 91: 162–172.

Khemir, E., Chekali, S., Moretti, A., Gharbi, M. S., Allagui, M. B., & Gargouri, S. (2020). Impacts of previous crops on inoculum of *Fusarium culmorum* in soil, and development of foot and root rot of durum wheat in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(1), 187-201.

Kilonzi, J. M.; Mafurah, J. J.; and Nyongesa, M. W. (2020). In vitro efficacy of *Trichoderma asperellum* and detached leaflet assay on late blight pathogen: Phytophthora infestans. *African Journal of Microbiology Research*, 14(5), 148-157.

Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., & Nagy, E. (2001). Breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains for heavy metal resistance. *Letters in Applied Microbiology*, 33(2), 112-116.

Kredics, L., Dóczi, I., Antal, Z., & Manczinger, L. (2001). Isolation and characterization of heavy metal resistant mutants from *mycoparasitic*

Trichoderma strains. *journal of the International Organization for Biological Control* (IOBC), 24(3), 233-236.

Küçük, Ç., Kivanç, M., Kinaci, E., & Kinaci, G. (2008). Determination of the growth and solubilizatio n capabilities of *Trichoderma harzianum* T1. *Biologia*, 63(2), 167-170.

Kumar, S. A. N. J. I. V., Kumar, R. A. K. E. S. H., & Om, H. A. R. I. (2013). Shelf-life of *Trichoderma viride* in talc and charcoal based formulations. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 83(5), 566-9.

Leslie, J. F., and Summerell, B. A. (2006). The Fusarium Laboratory Manu. *The Fusarium Laboratory Manu*.

Link, H. F. (1809). Observationes in Ordines Plantarum naturales. Dissertatio I. In Mag. *Ges. naturf. Freunde, Berlin* 3: 3-42.

Loew, O. (1900). A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science*, 11(279), 701-702.

Lopez-Perez, M., Rodriguez-Gomez, D., & Loera, O. (2015). Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(3), 334–341

Lozovaya, V. V., Lygin, A. V., Zernova, O. V., Li, S., Widholm, J. M., and Hartman, G. L.(2006). Lignin degradation by *Fusarium solani Fsp. glycines. Plant Disease*, 90(1), 7782.

Maitlo, S. A., Rajput, N. A., Syed, R. N., Khanzada, M. A., Rajput, A. Q., & Lodhi, A. M. (2019). Microbial control of Fusarium wilt of chickpea caused by *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. *Pakistan Journal of Botany*, 51(6), 2261-2268.

Mastouri, F.; Björkman, T.; and Harman, G. E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100(11), 1213-1221.

Mauch-Mani, B., & Mauch, F. (2005). The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current opinion in plant biology*, 8(4), 409-414.

Meister, R.T.(2000). Farm chemical Hand book. *Listing for "Beltanol"* . *Willough by oh* . 86.45p.

Miguel, j.; Covadonga, v.; Bele´n, p.; M. Teresa, g.j.. (2005). PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology*. 28 : 562–568.

Minibaeva, F. V., & Gordon, L. K. (2003). Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russian journal of plant physiology*, 50(3), 411-416.

Moekchantuk, T., & Kumar, P. (2004). Export okra production in Thailand. *Inter-country programme for vegetable IPM in South & SE Asia phase II Food & Agriculture Organization of the United Nations, Bangkok, Thailand*, 56(1) 3- 49.

Mohamed, B. F., Sallam, N. M., Alamri, S. A., Abo-Elyousr, K. A., Mostafa, Y. S., & Hashem, M. (2020). Approving the biocontrol method of potato wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) using Enterobacter cloacae PS14 and *Trichoderma asperellum* T34. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30, 1-13.

Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*, 4 :1 – 4.

Moyin-Jesu, E. I. (2007). Use of plant residues for improving soil fertility, pod nutrients, root growth and pod weight of okra (*Abelmoschus esculentum* L). *Bioresource technology*, 98(11), 2057-2064.

Muimba-Kankolongo, A. (2018). Food Crop Production by Smallholder Farmers in Southern Africa: Challenges and Opportunities for Improvement. *Academic Press*. CHAPTER 4: 23-39.

Nasreen, S., Khanzada, K. A., Jawed, A., & Azeem, M. T. (2019). Eco-friendly approaches for the control of root rot, wilt and leaf spot diseases of okra. *International Journal of Biology and Biotechnology*, 16(2), 421-424.

Nayaka, S. C., Shankar, A. C. G. U., Niranjana, S. R., & Prakash, H. S. (2008). Molecular detection and characterisation of *Fusarium verticillioides* in maize (Zea mays. L) grown in southern India. *Annals of microbiology*, 58(3), 359-367.

Ndunguru, J., & Rajabu, A. C. (2004). Effect of okra mosaic virus disease on the above-ground morphological yield components of okra in Tanzania. *Scientia Horticulturae*, 99(3-4), 225-235.

Nesmith, W. (2001). Fungicide application guidelines for commercial vegetables in kentucky.

Novy, V., Longus, K., & Nidetzky, B. (2015). From wheat straw to bioethanol: integrative analysis of a separate hydrolysis and co-fermentation process with implemented enzyme production. *Biotechnology for biofuels*, 8(1), 1-12.

Olaniyan, A. M., & Omoleyomi, B. D. (2013). Characteristics of okra under different process pretreatments and different drying conditions. *Journal of Food Processing and Technology*, 4(6), 2-11.

Omwango, E. O., Nyaga, E., Njagi, M., Orinda, G. O., & Wanjau, R. N. (2013). Nutrient enrichment of pineapple waste using Aspergillus niger and Trichoderma viride by solid state fermentation. African , 12, 6193–6196.

Paul, J. S.; Tiwari, K. L., and Jadhav, S. K. (2015). Long term preservation of commercial important fungi in glycerol at 4 C. *International Journal of Biological Chemistry*, 9(2), 79-85.

Perincherry, L., Lalak-Kańczugowska, J., & Stępień, Ł. (2019). *Fusarium*-produced mycotoxins in plant-pathogen interactions. *Toxins*, 11(11), 664.

Petrisor, C.; Paica, A., and Burnichi, F. (2019). physiological and growth response of tomatoplants after *Trichoderma* spp. seed treatments. *StudiaUniversitatis Babes-Bolyai,Chemia*, 64.

Pitchaimuthu, M., Dutta, O. P., & Swamy, K. R. M. (2012). Studies on inheritance of Geneic Male Sterility (GMS) and hybrid seed production in okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.]. *Journal of Horticultural Sciences*, 7(2), 199-202.

Pitotti , A. ; Elizalde, B.E. and Anese, M.(1995). Effect of caramellzation and maillard reaction products on peroxidase activity. *Journal of Food Biochemistry*.18:445-457 .

Poveda, J. (2020). *Trichoderma* parareesei favors the tolerance of rapeseed (*Brassica napus* L.) to salinity and drought due to a chorismate mutase. *Agronomy* 10:118.

Ranasingh, N., Saurabh, A., & Nedunchezhiyan, M. (2006). Use of *Trichoderma* in disease management. *Orissa Review*, 63(2-3), 68-70.

Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A. S., ... & Kaushal, J. (2020). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production*, 283(65), 2021-124657.

Rashid, M. H., Yasmin, L., Kibria, M. G., Mollik, A. K. M. S. R., & Hossain, S. M. (2002). Screening of okra germplasm for resistance to *yellow vein mosaic virus* under field conditions. *Pakistan Journal of Plant Pathology* (*Pakistan*). 1(40), 2-4.

Rath, N. C., Rasaputra, K. S., Liyanage, R., Huff, G. R., & Huff, W. E. (2011). Dithiocarbamate toxicity-an appraisal. *Pesticides in the modern world—effects of pesticides exposure*, 2011, 323-340.

Reino, J.L.; Guerrero, R. F.; Hernández-Galán, R. and Collado, I. G. (2007). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7(1):89–123.

Ruocco, M.; Lanzuise, S.; Vinale, F.; Marra, R.; Turrà, D.; Woo, S. L., and Lorito, M. (2009). Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(3), 291-301.

Saeki, K., ISHIKAWA, O., FUKUOKA, T., NAKAGAWA, H., KAI, Y., KAKUNO, T., ... & HORIO, T. (1986). Barley leaf peroxidase: purification and characterization. *The Journal of Biochemistry*, 99(2), 485-494.

Sáenz-Mata, J., & Jiménez-Bremont, J. F. (2012). HR4 gene is induced in the Arabidopsis-*Trichoderma atroviride* beneficial interaction. *International journal of molecular sciences*, 13(7), 9110-9128.

Sain, S. K., & Pandey, A. K. (2018). Evaluation of some *Trichoderma harzianum* isolates for the management of soilborne diseases of brinjal and okra. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: *Biological Sciences*, 88(3), 905-914.

Sala, A., Barrena, R., Artola, A., & Sánchez, A. (2019). Current developments in the production of fungal biological control agents by solid-state fermentation using organic solid waste. Critical *Reviews in Environmental Science and Technology*, 49(8), 655-694.

Saldajeno, M. G. B., Naznin, H. A., Elsharkawy, M. M., Shimizu, M., & Hyakumachi, M. (2014). Enhanced Resistance of Plants to Disease Using *Trichoderma* spp. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, 477-493.

Salih, Y. A., & Mansoor, N. M. (2019). Fungicide Topsin-M and their Interaction on Root Rot Disease of Okra *Abelmoschus esculentus* in the Field. College of Agriculture, *University of Basrah*. 32(2) : 320-336.

Santa, H. S. D., Santa, O. R. D., Brand, D., Vandenberghe, L. P. D. S., & Soccol, C. R. (2005). Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(spe), 51–60.

Sariah, M., Choo, C. W., Zakaria, H., & Norihan, M. S. (2005). Quantification and characterisation of *Trichoderma* spp. from different ecosystems. *Mycopathologia*, 159(1), 113-117.

Sawant, I. S.; Wadkar, P. N.; Ghule, S. B.; Salunkhe, V. P., Chavan, V.; and Sawant, S. D. (2020). Induction of systemic resistance in grapevines against powdery mildew by *Trichoderma asperelloides* strains. *Australasian Plant Pathology*, 49(2), 107-117.

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(4), 323-341.

Sebastian, K. and Richard, A. S. (2006). Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 for the biological control of the northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla* Chitwood. *Biocontrol Science and Technology* 16, 535-546 .

Seifert K (1996). *Fusarium interactive* key. *Agriculture and Agri Food Canada*, pp 1–65.

Seifert, K. A., Samson, R. A., Dewaard, J. R., Houbraken, J., Lévesque, C. A., Moncalvo, J. M., ... & Hebert, P. D. (2007). Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with Penicillium as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(10), 3901-3906.

Shafique, H. A., Noreen, R. U. B. I. N. A., Sultana, V., Ara, J., & Ehteshamul-Haque, S. (2015). Effect of endophytic *Pseudomonas aeruginosa* and *Trichoderma harzianum* on soil-borne diseases, mycorrhizae and induction of systemic resistance in okra grown in soil amended with *Vernonia anthelmintica* (L.) seed's powder. *Pakistan Journal of Botany*, 47(6), 2421-2426.

Shahbazi , H.; Taeb,M; Bihamta,M.R. and Darvish ,F. (2009). Inheritance of Antioxidant Activity of Bread Wheat under Terminal Drought Stress. *Journal of Agriculture and Environment*., 6(3) :298-302.

Simay, E. I. (1993). Effect of *Fusarium* spp. on faba bean seeds during germination [Vicia faba]. *Faba Bean Information Service*. ACTA AGRARIA DEBRECENIENSIS.1(2),232-235.

Singh, A. and Islam, M.N. (2010). In vitro evaluation of *Trichoderma* spp. aginst *Phytophthora nicotianae*. *Journal of Experimental Agriculture International*,(1): 20 – 25.

Singh, P., Chauhan, V., Tiwari, B. K., Chauhan, S. S., Simon, S., Bilal, S., & Abidi, A. B. (2014). An overview on okra (*Abelmoschus esculentus*) and it's importance as a nutritive vegetable in the world. *International journal of Pharmacy and Biological sciences*, 4(2), 227-233.

Šišić A, Baćanović J, Al-Hatmi AM, Karlovsky P, Ahmed SA, Maier W . (2018). The 'forma specialis' issue in *Fusarium*: a case study in *Fusarium solani f. sp. pisi*. *Scientific Reports*, 8(1):1252

Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., & Vitti, A. (2015). Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 13561-13578.

Solankey, S. S., Akhtar, S., Kumar, R., Verma, R. B., & Sahajanand, K. (2014). Seasonal response of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) genotypes for *okra yellow vein mosaic virus* incidence. *African Journal of Biotechnology*, 13(12), 1336- 1342.

Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., ... & Sharma, A. (2020). *Trichoderma*: the "secrets" of a multitalented biocontrol agent. *Plants*, 9(6), 762- 793.

Stack, A. J., Yaghmour, M. A., Kirkpatrick, S. C., Gordon, T. R., and Bostock, R. M. (2017). First report of *Fusarium brachygibbosum* causing cankers in cold-stored, bare-root propagated almond trees in California. *Plant Disease*, 101(2), 390-390.

Stępień, Ł., & Chełkowski, J. (2010). Fusarium head blight of wheat: pathogenic species and their mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*, 3(2), 107-119.

Sun, M., & Liu, X. (2006). Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathologia*, 161(5), 295-305.

Sun, T. P., & Gubler, F. (2004). Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. Annu. Rev. *Plant Biol*., 55, 197-223.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.

Tanabe, S., Ishii-Minami, N., Saitoh, K. I., Otake, Y., Kaku, H., Shibuya, N., ... & Minami, E. (2011). The role of catalase-peroxidase secreted by Magnaporthe oryzae during early infection of rice cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(2), 163-171.

Topolovec-Pintarić, S. (2019). *Trichoderma*: invisible partner for visible impact on agriculture. U: *Trichoderma*: The most widely used Fungicide.(ur. Shah MM Sharif U., Buhari TR). *IntechOpen, London*, 15-35.

Ubalua, A. O., & Oti, E. (2007). Antagonistic properties of *Trichoderma viride* on post harvest cassava root rot pathogens. *African Journal of Biotechnology*, 6(21), 2447-2450.

Vera-Sirera, F., Gomez, M. D., & Perez-Amador, M. A. (2016). DELLA proteins, a group of GRAS transcription regulators that mediate gibberellin signaling. *Plant transcription factors*, Academic Press. (pp. 313-328).

Vey, A., Hoagland, R. E., & Butt, T. M. (2001). Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. Fungi as biocontrol agents: *progress, problems and potential*, 1, 311-346.

Vinale, F., Ghisalberti, E. L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., ... & Lorito, M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in applied microbiology*, 48(6), 705-711.

Wanjiru, M. M. (2009). Effect of *Trichoderma harzianum* and *arbuscular mycorrhizal* fungi on growth of tea cuttings, napier grass and disease management in tomato seedlings (Doctoral dissertation, Kenyatta University), 1-97.

Wedajo,B.(2015). Compatibility studies of fungicides with combination of *Trichoderma* species under in vitro conditions. *Virol Mycology* 4:149.

Weller, D.M., J.M. Raaijimakers, B.B.M. Gardener and L.S. Thomashow (2002). Microbial population responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*., 40: 309-348.

White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. H.; Taylor, J. W. (1990). PCR protocols: a guide to methods and application. *Academic Press, London*.

Wiest, A., Grzegorski, D., Xu, B. W., Goulard, C., Rebuffat, S., Ebbole, D. J., ... & Kenerley, C. (2002). Identification of peptaibols from

Trichoderma virens and cloning of a peptaibol synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), 20862-20868..

Williams, W. W.; Mackey, K., and Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 22(3), 474-481

Xia, B., Hu, J. Y., Zhu, X. F., Liang, Y., Ren, X., Wu, Y. H., & Chen, D. X. (2018). First report of sunflower broomrape wilt caused by *Fusarium brachygibbosum* in China. *Plant disease*, 102(11), 2372-2372.

Yamaguchi, K., Mori, H., & Nishimura, M. (1995). A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant and Cell Physiology*, 36(6), 1157-1162.

Yang, X.H.; G.Z. Lu; Z.H. Zhao; L.L. Liu, and X.M. Yao. (2007). Isolation and identification of *Fusarium* species from cucumber wilt diseased plants in vegetable greenhouses in northeastern China. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 38(3): 308-311.

Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y., & Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and soil*, 235(2), 235-242.

Youssef, S. A., Tartoura, K. A., & Abdelraouf, G. A. (2016). Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging enzymes and improving tomato growth infected by *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*, 100, 79-86.

Yuan, M.; Huang, Y.; Ge, W., Jia, Z.; Song, S., Zhang, L.; and Huang, Y. (2019). Involvement of jasmonic acid, ethylene and salicylic acid signaling pathways behind the systemic resistance induced by

Trichoderma longibrachiatum H9 in cucumber. *BMC genomics*,20(1), 144.

Zafra, G., Moreno-Montaño, A., Absalón, Á. E., & Cortés-Espinosa, D. V. (2015). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(2), 1034-1042.

Zhang, J. D., & Yang, Q. (2015). Optimization of solid-state fermentation conditions for *Trichoderma harzianum* using an orthogonal test. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 1771-1781.

Zhang, J. D., & Yang, Q. (2015). Optimization of solid-state fermentation conditions for *Trichoderma harzianum* using an orthogonal test. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 1771–1781.

Zhang, S., Zhao, X., Wang, Y., Li, J. I. N. G., Chen, X., Wang, A., & Li, J. (2012). Moleculardetection of *Fusarium oxysporum* in the infected cucumber plants and soil. *Pakistan Journal of Botany*, 44(4), 1445-1451.

Abstract

This study aimed to isolate and diagnose the pathogen of seed and seedling rot disease from infected okra roots [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench] and its control using the chemical fungicide Topsin M and some species of *Trichoderma* spp. (*T. atroviride*, *T. longibrachaitum*, *T. asperellum*, and *T. aspirelloides*) and finding an integrated formula among them in the control of the pathogen. The current study also aimed at the possibility of manufacturing a biological preparation using different species of *Trichoderma* spp.. All the experiments of this study were carried out in the Plant Protection Department/ College of Agriculture/ Karbala University during the agricultural season 2020-2021.

The results showed the possibility of isolating 15 fungal isolates that were morphologically diagnosed to be species belong to *Fusarium* spp.. The results of the pathogenicity test of the 15 isolates in plastic pots proved that all isolates were pathogenic and the rates of inhibition of seed germination ranged between 0.00%-73.30%, with a significant difference from the percentage of germination in the control treatment, which amounted to 100%. Among those isolates, the isolate (5) was the most pathogenic compared to other isolates by preventing seed germination (0.00%) compared to isolate (1) which had little effect in reducing the percentage of seed germination (72.60%). The isolate 5 was diagnosed as *Fusarium culmorum* by relying on morphological as well as molecular characteristics and using the polymerase chain reaction technology (PCR) and determination of the sequence of nitrogenous bases.

The results proved that all species of *Trichoderma* spp. had a significant effect in inhibiting *F. culmorum* compared to control treatment (pathogenic fungus alone). The two species of *T. harzianum* (1) and *T. aspirelloides* (5) showed a high efficiency in inhibiting the growth of pathogenic funus (88.00% and 87.66%, respectively), while it was found that the lowest inhibition rate of the pathogenic fungus (66.66%) was for the fungus species (1). The results showed that there was an antagonistic ability between *T. harzianum* (1) and *T. longibrachaitum* (3) and *T. asperellum* (4), while *T. harzianum* (1) did not show antagonistic ability against species *T. atroviride* (2) and *T. aspirelloides* (5). It was observed that the highest inhibitory ability of *Trichoderma* spp. against *F. culmorum* when all the biological control fungi were present together in the same Petri-dish, the inhibition rate for the pathogenic fungus was 95%. The results also demonstrated that the concentrations (20, 40, 60, and 80%) of filtrate of *Trichoderma* spp. had a clear effect in increasing the germination rates of

okra, maize, and radish seeds. The 100% concentration was the most encouraging for seed germination and an increase in the dry weight of the plants mentioned above.

The results also showed that the presence of *Trichoderma* spp. alone or together had a positive effect in increasing the content of peroxidase enzyme (POD) in okra plants compared to plants grown in soil not infested with any of the fungi as well as infested soil with *F. culmorum*, it was proved that the highest level of peroxidase enzyme (POD) was in plants grown in soil infested with all species of *Trichoderma* spp. and *Fusarium culmorum*, with an average of 6.87 units. mg protein^{-1} and *T. aspirelloides* (5) was the best among the other species in increasing the level of peroxidase enzyme (POD) with an average of 1.07 units. mg protein^{-1}. As for the enzyme catalase, it was observed that its highest level was in plants grown in soil infested with *Trichoderma* spp. and *F. culmorum* amounting to 322.32 units. Mg. protein^{-1}.

The results showed that *Trichoderma* spp. had an effect on stimulating the plant on the production of the hormone abscisic acid, at a rate of 13.22 mg. L^{-1}, which differed significantly from its content in plants grown in the control treatment, which averaged 22.60 mg. L^{-1}. The results also proved that the presence of the fungus *Trichoderma* spp. A clear role in increasing the plant content of gibberellin hormone (GA_3), which was the highest level (85.09 mg. L^{-1}) in plants grown in soil infested with all species of *Trichoderma* spp. compared to its content in the control plants (not infested with any fungus), which amounted to 43.33 mg. liter $^{-1}$. It was also found that *Trichoderma* spp. used in this study, the ability to grow in most concentrations of the chemical pesticide Topsin M(0.25, 0.50, 0.75, 1.00, and 1.25 ml/ L) and the concentration was 0.25 ml/ L the least inhibiting for all species of *Trichoderma* spp., while the growth inhibition of the fungus *F. culmorum* under the influence of the same concentration 82.35%. It was verified when grown on sterilized and crushed baker's medium and iron added to it at a concentration of 0.75 gm commercial substance/ liter and loaded on talc and stored in paper bags. m and stored in laboratory conditions with 105.96 and 96.77 reproductive units/ml, respectively. It was also found that the development of the fungus *Trichoderma* spp. On the ground and sterilized baker and storing it without any carrier material was the best in maintaining the vitality of the fungus *Trichoderma* spp. compared to its loading on the carriers (349.33 reproductive units/ ml), which encourages the use of sterilized and ground baker's plant in growing *Trichoderma* spp. Species.

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Karbala

College of Agriculture

Department of Plant Production

Evaluation of the interaction between some species of *Trichoderma* spp. And Topsin M pesticide in the fight against okra root rot

Thesis submitted to

The Coucil of the College of Agriculture University of Kerbala as partial Fulfillment of the Requirements for Degree of Master of Sciences in Agriculture – Plant Protection

By

Ahmed Majed Mahmood

Superviser By

Asst. Prof. Dr Aqeel Nazzal AL-Abdey

1443 A.H **2021 A.D**