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

التشخيص الجزيئي لبعض عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* spp. المعزولة من محافظات العراق والمنتجة للسم الفطري Gliotoxin وتقويم فعاليته ضد بعض مسببات امراض نبات الخيار

تقدمت بها

شهد علي محمد البحراني

إلى مجلس كلية الزراعة – جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير

في العلوم الزراعية – وقاية النبات

بإشراف

أ.م.د. ياسر ناصر حسين الحميري

1443 هـ 2021 م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَلَقَدْ آتَيْنَا دَاوُودَ وَسُلَيْمَانَ عِلْمًا وَقَالَا الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي فَضَّلَنَا عَلَىٰ كَثِيرٍ مِنْ عِبَادِهِ الْمُؤْمِنِينَ ﴾

صدق الله العلي العظيم

(النمل: 15)

الإهداء

إلى سيد الأولين والأخرين وأفضل المخلوقين وأكرم السابقين واللاحقين رسولنا محمد (ص) وأل بيته الطيبين الطاهرين....

إلى من اشتاق إليه بكل جوارحي الى من شرفني حمل اسمه الى من علمني معنى الحياة أبي رحمه الله ....

إلى اغلى ما لدي في هذه الدنيا الى من أحق الناس بالشكر ولولاها ما وطئت قدماي في هذه الدنيا أمي الحبيبة ....

الى من قاسموني فرحي وهمومي الى من اشدد بهم آزري (إخوتي وأخواتي)...

الى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة زملائي و زميلاتي ...

الى كل روح شاركتني بدعائها...

أهدى إليكم ثمرة جهدي ....

شهد

الشُكر والتقدير

بعد اتمام العمل لا يوجد شيء اجمل ولا احلى من الحمد فالحمد لله دائما وابدا.....

لا يسعني وانا اضع اللمسات الأخيرة في هذه الرسالة الا ان أتقدم بالشكر الى كل من كانت له فيها مساهمة ولو بسيطة .....

واخص بالشكر الى صاحب القلب الكبير والنفس الطويل والعلم الوفير الذي غمرني بعطفه الابوي الدكتور ياسر ناصر حسين الحميري المشرف على هذه الرسالة والذي كان له الفضل بعد الله عز وجل في إنارة طريق البحث لي من خلال توجيهاته وارشاداته لإنجاز هذه الرسالة على أكمل وجه كما اقدر فضله تفانيا في تعليمي خلال البحث ....

ثم لا يسعني الا ان أشيد بالفضل واقر بالمعروف لكل من ساهم في انجاز هذا البحث واخص بالذكر الدكتور مشتاق طالب القريشي والدكتور عدنان عبد الجليل لهوف والدكتورة رجاء غازي الجنابي والدكتور عباس علي العامري والست اقبال زهو لتقديمهم وافر العون في انجاز البحث ، وكما لا يمكنني نسيان جهود طلبة الدراسات العليا لما قدموه من جهود وتعاون طيلة مدة الدراسة و أتقدم بالشكر الخالص الى كل من كان له الفضل من قريب أو بعيد في انجاز هذا البحث....

كما اشكر كل من مد لي يد العون ولو بالدعاء بظهر الغيب ....

شكرا من القلب ....

شهد

اقـرار لجنـة المناقشـة

نشهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة اطلعنا على الرسالة الموسومة بـ التشخيص الجزيئي لبعض عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* spp. المعزولة من محافظات العراق والمنتجة للسم الفطري Gliotoxin وتقويم فعاليته ضد بعض مسببات امراض نبات الخيار، وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها ووجدنا انها جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير في العلوم الزراعية – وقاية النبات

الاستاذ الدكتورة
رجاء غازي عبد المحسن
رئيس اللجنة

الاستاذ المساعد الدكتور
عبد الزهرة جبار علي
عضوا″

الاستاذ المساعد الدكتورة
بان موسى حسن
عضوا″

الاستاذ المساعد الدكتور
ياسر ناصر حسين الحميري
عضوا″ ومشرفا″

صدقت الرسالة من مجلس كلية الزراعة / جامعة كربلاء

الدكتور
أ.د. ثامر كريم خضير الجنابي
عميد كلية الزراعة / جامعة كربلاء

إقرار المشرف

أشهد بأن الرسالة الموسومة (التشخيص الجزيئي لبعض عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* spp. المعزولة من محافظات العراق والمنتجة للسم الفطري Gliotoxin وتقويم فعاليته ضد بعض مسببات امراض نبات الخيار) التي قدمتها الطالبة (شهد علي محمد) قد تم اعدادها بإشرافي في كلية الزراعة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في العلوم الزراعية / وقاية النبات.

التوقيع :

اسم المشرف : أ.م.د. ياسر ناصر حسين الحميري

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ : / / 2021

توصية رئيس القسم

بناءً على توصية الاستاذ المشرف ارشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الاسم : أ.م.د. ياسر ناصر حسين الحميري

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ : / / 2021

المستخلص

هدفت هذه الدراسة إلى العزل والتشخيص الجزيئي للفطر *Trichoderma spp.* من عينات التربة الملامسة لجذور النباتات السليمة من مختلف محافظات العراق (كربلاء ، بابل، الديوانية ، بغداد ، الناصرية ، النجف ، كركوك ، الموصل ، الكوت ، ديالى) واختبار مقدرتها على انتاج السم الفطري Gliotoxin ، ودورها في استحثاث المقاومة الجهازية وامكانية استخدام توليفة من هذه العزلات المنتخبة في المكافحة الاحيائية ضد المسببات المرضية النباتية المختلفة .

نفذت تجارب هذه الدراسة في قسم وقاية النبات/ كلية الزراعة/ جامعة كربلاء خلال الموسم الزراعي 2020-2021.اذ بينت نتائج اختبار المقدرة الامراضية أنَ معظم عزلات الفـطريات الممرضة *Fusarium* sp.، *Sclerotinia* sp. ،*Rhizoctonia* sp. ، *Pythium* sp. المختبرة أحدثت خفضاً مـعنوياً بنسبة انبات بذور اللهانة تراوحت بين (16.60– 60.00%) قياساً بمعاملة السيطرة التي بلغت 93.33 %.

وأوضحت اختبارات المقدرة التضادية لـ 53 عزلة فطرية *Trichoderma* spp. على الوسط الزرعي PDA مختبريا ان 11 عزلة فطرية كانت ذات كفاءة تضادية عالية وبفرق معنوي عن بقية العزلات الأخرى قياسا بمعاملة السيطرة ، اذ كانت نسبة التثبيط ضد الفطر الممرض *Fusarium* sp. (27.77_ 90.73 %) و ضد الفطر الممرض *Pythium* sp. (20.36_ 88.88 %) و ضد الممرض *Rhizoctonia* sp. (31.48_89.03 %) اما ضد الفطر *Sclerotinia* sp (20.36_ 88.88 %) على التوالي بينما تبين حقلياً أنَّ جميع العزلات (11) المنتخبة اظهرت قدرة تضادية عالية ضد الفطريات الممرضة *Fusarium* sp. ، *Rhizoctonia* sp. ، *Pythium* sp. في الاصص البلاستيكية اذ تراوحت النسبة المئوية لموت البادرات ، بين (25.00 – 35.71 %) قياساً بمعاملة السيطرة الفطر الممرض بمفردهِ التي كانت 93.33% .

وقد اظهرت نتائج التشخيص الجزيئي لـ 11 عزلة المنتخبة من الفطر *Trichoderma* spp. عن طريق تحليل التتابع النيوكليوتيدي ، ومقارنتها باستخدام برنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) أنَّ جميع عزلات الفطر كانت ذات اختلافٍ وراثي مع العزلات التابعة لهذه الانواع نفسها والمسجلة في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية

و انها تابعة للانواع (NCBI) National Center for Biotecnology Information, *T.reesei* (YShK8 ،YShR15 ، YShN9 ، YShB10)و *T.viride* (YShB4) و(YShD7 ، YShN4) *T. harzianum* و (YShD9) *T. koningii* و(YShH7 ، YShH8) *T. pseudokoningii* و (YShM2) *T. koningiopsis* لذا تم تسجيلها بأسماء الباحثين و تحت ارقام الادخال المحددة .

كما برهنت النتائج ايضا أنَّ لرواشح 11 عزلة للفطر *Trichoderma* spp. تاثيراتً متباينة في تثبيط نمو الفطريات الممرضة *Fusarium* sp.، *Rhizoctonia* sp. ، *Pythium* sp. إذ اظهرت كفاءة تضادية عالية، اذ بلغ معدل نسبة التثبيط للممرضات (21.51–71.92%) مقارنة بمعاملة السيطرة 0.00% في حين أظهر اختبار الكشف عن قدرة العزلات الفطرية على انتاج السم الفطري Gliotoxin باستخدام تقانة HPLC بأنَّ العزلات الفطرية T.B4 ، T.D9 ، T.H7 ، T.N4 ، T.M2 كانت قادرةً على انتاج السم الفطري Gliotoxin ، حيث كان أعلى تركيزٍ للعزلة T.N4 هو 132.8 مكغم / غم واقل تركيز للعزلة T.D9 76.92 مكغم / غم.

كما أثبتت قدرت العزلات المنتخبة على استحثاث المقاومة الجهازية في النباتات ضد المسببات المرضية عن طريق زيادة فاعلية انزيم البولي فينول اوكســـديز PPO , وانزيم البيروكسيديز POD , وزيادة المحتوى الكلي للفينولات . و اظهرت نتائج اختبار التضاد الحيوي لعزلات الفطر.*Trichoderma* spp (T.B4 ، T.D9 ، T.H7 ، T.N4 ، T.M2) فيما بينها ، لم يظهر اي مؤشر تضاد حيوي بين العزلات الفطرية (T.B4 ،T.N4 ، T.M2) في حين اظهرت العزلتين (T.D9 ،T.H7) مؤشرَ تضادٍ حيوي بينها وبين بقية العزلات الفطرية .

وأظهرت نتائج التجربة الحقلية لتقييم دور التوليفة بين العزلات الفطرية (T.B4 ،T.N4 ، T.M2) المنتجة للسم الفطري Gliotoxin والمنتجة لمركبات الاستحثاث في السيطرة على مسببات أمراض النبات ، بان أنواع الفطر *Trichoderma* spp. ثبطت النسبة المئوية للفطر *Fusarium* sp. عند استخدامها بشكل منفرد اذ تراوحت بين (00.00_60.00 %) وانخفضت النسبة المئوية للمرض معنوياً عند تداخل اكثر من عزلة من عزلات الفطر قياسا بمعاملة المقارنة للفطر الممرض اذ بلغت (96.66%) و ازداد نسب التثبيط للفطر الممرض معنويا عند المعاملة بالعزلتين (T.B4 + T.N4) و (T.N4 + T.M2) (T.M2 + T.B4)

وكذلك عند المعاملة بالعزلات الثلاث من الفطر *Trichoderma* spp. (T. B4 + T.N4+ T. M2) ، و ثبطت النسبة المئوية للفطر *Pythium sp* عند استخدامها بشكل منفرد اذ تراوحت بين (00.00_56.00 %) وانخفضت النسبة المئوية للمرض معنوياً عند تداخل اكثر من عزلة من عزلات الفطر قياسا بمعاملة المقارنة للفطر الممرض اذ بلغت (96.66%) و ازداد نسب التثبيط للفطر الممرض معنويا عند المعاملة بالعزلتين (T.B4 + T.N4) و (T.N4 + T.M2) (T.M2 + T.B4) وكذلك عند المعاملة بالعزلات الثلاث من الفطر *Trichoderma* spp.(T. B4 + T. M2 +T.N4)، و ثبطت النسبة المئوية للفطر *Rhizoctonia* sp. عند استخدامها بشكل منفرد اذ تراوحت بين (00.00_56.00 %) وانخفضت النسبة المئوية للمرض معنوياً عند تداخل اكثر من عزلة من عزلات الفطر قياسا بمعاملة المقارنة للفطر الممرض اذ بلغت (96.66%) . و ازداد نسب التثبيط للفطر الممرض معنويا عند المعاملة بالعزلتين (T.B4 + T.N4) و (T.N4 + T.M2) (T.M2 + T.B4) وكذلك عند المعاملة بالعزلات الثلاث من الفطر *Trichoderma* spp. (T. B4 + T.N4+ T. M2) .

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
1	**المقدمة**	1
2	**مراجعة المصادر**	4
1- 2	الفطر الاحيائي *Trichoderma* spp. تصنيفه وصفاته التصنيفية	4
2-2	مجالات استخدام الفطر *Trichoderma* spp.	5
1-2-2	المكافحة الاحيائية لمسببات امراض النبات.	5
2-2-2	استحثاث المقاومة ضد الامراض النباتية .	6
3-2-2	انتاج المركبات الشبيه بمنظمات النمو النباتية .	7
4-2-2	استخدام مركبات الايض الثانوي لها في صناعة الادوية.	7
5-2-2	استخدامها في مكافحة الحشرات .	8
6-2-2	يدخل ضمن تصنيع المبيدات الزراعية (او تحسين صفات المبيد) .	8
7-2-2	يستخدم في التحطيم الحيوي للمبيدات الكيميائية	9
8-2-2	يستخدم في الصناعات المختلفة	10
3-2	دور الفطر الاحيائي *Trichoderma* spp. في المكافحة الاحيائية	10
3-2	ومن اهم الاليات التي يستخدمها الفطر *Trichoderma spp.* في المكافحة الاحيائية	11
1-3-2	المضادات الحياتية Antibiotics	11
2-3 -2	الإنزيمات Enzymes	12
3-3-2	التطفـــــــــل الفطري Mycoparasitism	12
4- 3-2	التنـــافس Competition	13
5-3-2	إستحثاث المقاومة الجهازية Induced Systemic Resistance	13
6-3-2	تثبيط إنزيمات الفـطر الممرض	14
4-2	أنواع الفطر*Trichoderma* spp. المستخدمة في المجالات الزراعية في العراق	14
5-2	مركبات الايض الثانوي المنتجة من قبل بعض أنواع *Trichoderma* spp.	15
6-2	دور السموم الفطرية المنتجة من قبل انواع الفطر *Trichoderma* spp. في السيطرة على مسببات امراض النبات	17
7-2	السم الفطري Gliotoxin المنتج من قبل الفطر *Trichoderma* spp.	17
8-2	دور الفطر *Trichoderma* spp. في استحثاث المقاومة الجهازية للنباتات ضد المسببات المرضية	20
9-2	التداخل بين أنواع او عزلات الفطر *Trichoderma* spp.	21
10-2	تصنيع المبيدات الاحيائية التي يدخل في تركيبها الفطر *Trichoderma* spp.	22
11-2	التشخيص الجزئي للفطر *Trichoderma* spp. وسمومه الفطرية	23
12-2	طرق الكشف عن السموم الفطرية	24
1-13-2	كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء High performance liquid	24

	(HPLC) chromatography	
3	**المواد وطرائق العمل Materials and Methods**	25
1-3	الأجهزة والادوات والمواد المستخدمة في أجراء التجارب	25
2-3	تحضير الأوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص وتنمية الفطريات	28
1-2-3	وسط البطاطا سكروز اجار (P.S.A) Potato Sucrose Agar)	28
2-2-3	وسط البطاطا دكستروز آكار الجاهز P.D.A. Potato Dextrose Agar	28
3-2-3	وسط الاكار المائي (W.A) Water Agar	28
4-2-3	وسط البطاطا سكروز السائل (P.S.B.) Potato Sucrose Broth	29
5-2-3	وسط الرز	29
6-2-3	وسط الدخن	29
7-2-3	وسط جريش الذرة الصفراء	29
3-3	جمع العينات	30
1-3-3	جمع عينات التربة	30
2-3-3	جمع عينات نباتات الخيار المصابة	30
4-3	العزل والتشخيص	32
1-4-3	عزل وتشخيص فطريات *Trichoderma* spp. من عينات التربة	32
2-4-3	عزل الفطريات الممرضة المرافقة لنباتات الخيار المصابة .	32
5-3	تنقية وتشخيص الفطريات المعزولة	32
6-3	حفظ العزلات الفطرية المعزولة	33
7-3	اختبارات المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *Fusarium spp* و *Rhizoctonia sp* و *Pythium sp* مختبرياً .	34
8-3	تحضير اللقاح الفطري لكل من العزلات الفطرية المحددة	35
9-3	اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد العزلات الفطرية الممرضة .	35
1-9-3	اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر Trichoderma spp ضد العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	35
2-9-3	اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد العزلات الفطرية الممرضة حقلياً في الاصص البلاستيكية	37
10-3	اختبار دور عزلات الفطر *Trichoderma spp* في استحثاث المقاومة الجهازية في النبات ضد الفطريات الممرضة	38
11-3	قياس بعض مؤشرات استحثاث المقاومة الجهازية النباتية بفعل عزلات الفطر *Trichoderma spp*	38
1-11-3	قياس فعالية انزيم بولي فينول اوكسيديز (PPO) Poly Phenol Oxidase	38
2-11-3	قياس فعالية انزيم البيروكسيديز الـ(POD) Peroxidase	39
3-11-3	قياس فعالية الفينولات الكلية	40
12-3	تاثير راشح عزلات الفطر *Trichoderma sp* في النمو القطري لعزلات الفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA مختبريا	41

13-3	الكشف عن قابلية عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma sp* المنتخبة على انتاج السم الفطري الكليوتوكسين (Gliotoxin)	42
1-13-3	استخلاص السم الفطري الكليوتوكسين (Gliotoxin) من مزارع العزلات الفطرية	42
2-13-3	التقدير الكمي والنوعي لسم Gliotoxin باستخدام تقانة كروموتوكرافيا السائل فايق الأداء High Performance Liquid Chromatography (HPLC) لمستخلص عزلات الفطر Trichoderma sp	42
14-3	التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية التابعة للفطر *Trichoderma spp* المنتخبة	43
15 –3	الخصائص الكيميائية للتربة Soil chemical properties المعزول منها عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma sp* المنتخبة	44
1-15-3	قياس درجة تفاعل التربة (PH)	44
2-15-3	قياس التوصيلية الكهربائية (E.C)	44
3-15-3	قياس الكاربون العضوي والمادة العضوية	45
16-3	اختبار التوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma spp* المنتجة للسم الفطري الكليوتوكسين ومركبات الاستحثاث ضد العزلات الفطرية	46
1-16-3	اختبار التضاد الحيوي لعدد من عزلات الفطر *Trichoderma spp* المنتجة للسم الفطري الكليوتوكسين ومركبات الاستحثاث فيما بينها مختبريا على وسط PDA	46
2-16-3	اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma spp* المنتجة للسم الفطري Gliotoxin ومركبات الاستحثاث ضد العزلات الفطرية الممرضة حقلياً في الاصص البلاستيكية .	47
17-3	التصاميم الإحصائية للتجارب المختبرية والحقلية	49
4	**النتائج والمناقشة**	50
1-4	العزل والتشخيص	50
1-1-4	عزل وتشخيص فطريات *Trichoderma spp* من عينات التربة	50
2-1-4	عزل الفطريات الممرضة المرافقة لنباتات الخيار المصابة .	52
2-4	اختبارات المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *Fusarium spp* و *Rhizoctonia sp* و *Pythium sp* و *Sclerotinia sp* مختبرياً .	54
3-4	اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد العزلات الفطرية الممرضة	55
1-3-4	اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	55
2-3-4	اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد العزلات الفطرية الممرضة حقلياً في الاصص البلاستيكية.	61
4-4	دور عزلات الفطر *Trichoderma spp* في استحثاث المقاومة الجهازية في النبات ضد الفطريين الممرضين *Fusarium sp* و *Rhizoctonia sp*	67
5 -4	تاثير راشح عزلات الفطر *Trichoderma sp* في النمو القطري لعزلات الفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA مختبريا	70

6-4	التقدير الكمي والنوعي لسم Gliotoxin باستخدام تقانة كروموتوكرافيا السائل فايق الأداء High Performance (HPLC) Liquid Chromatography لمستخلص عزلات الفطر *Trichoderma sp*	72
7-4	التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية التابعة للفطر *Trichoderma spp* المنتخبة	76
1-7-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة *Trichoderma viride (Y.N.135.Shahad)* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)	77
2- 7-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة *Trichoderma koningiopsis (Y.N.136.Shahad)* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)	79
3-7-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة *Trichoderma harzianum (Y.N.137.Shahad)* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)	81
4-7-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة(*Trichoderma koningii Y.N.138.Shahad*) ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)	82
5-7-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة *Trichoderma pseudokoningii (Y.N.139.Shahad)* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)	84
6-7-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة *Trichoderma pseudokoningii (Y.N.140.Shahad* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)	85
7-7-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة *Trichoderma reesei (Y.N.141.Shahad)* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)	87
8-7-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة *Trichoderma koningiopsis (Y.N.142.Shahad)* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)	88

9-7-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة (*Trichoderma harzianum Y.N.143.Shahad*) ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)	90
10-7-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة *Trichoderma reesei (Y.N.144.Shahad)* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)	91
11-7-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة(*Trichoderma reesei Y.N.145.Shahad*)ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI)	93
8 –4	الخصائص الكيميائية للتربة Soil chemical properties المعزول منها عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma sp* المنتخبة	94
9-4	اختبار التضاد الحيوي لعدد من عزلات الفطر *Trichoderma spp* المنتجة للسم الفطري الكليوتوكسين ومركبات الاستحثاث فيما بينها مختبريا على وسط PDA	96
10 -4	اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma spp* المنتجة للسم الفطري الكليوتوكسين ومركبات الاستحثاث ضد العزلات الفطرية الممرضة حقلياً في الاصص البلاستيكية .	97
5	**الاستنتاجات والتوصيات**	103
1-5	الاستنتاجات	103
2-5	التوصيات	104
6	**المصادر**	105
1-6	المصادر العربية	105
2-6	المصادر الأجنبية	109
7	**الملاحق**	132

رقم الجدول	الموضوع	رقم الصفحة
جدول رقم 1	الأجهزة والادوات المستخدمة في أجراء التجارب الواردة في البحث	25
جدول رقم 2	المواد الكيميائية المستعملة في إجراء التجارب الواردة في هذه الدراسة	26
جدول رقم 3	الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة	27
جدول رقم 4	جميع الفطريات المستخدمة بالدراسة	27
جدول رقم 5	رموز العينات ومكان جمعها ونوع النباتات التي جمعت بالقرب من جذورها	31
جدول رقم 6	ترميز عزلات الفطر *Trichoderma spp* التي اظهرت مقدرة	44

	تضـادية عاليـة وتـم ارسـالها الـى شـركة Macrogen الكوريـة الجنوبية للتشخيص الجزيئي .	
جدول رقم 7	المعـاملات التضـادية بـين عـزلات الفطـر *Trichoderma spp* المنتخبة	47
جدول رقم 8	يوضـح العـزلات الفطريـة المرافقـة لعينـات التربـة المجموعـة مـن محافظات العراق	52
جدول رقم 9	يوضح العزلات الفطرية المرافقة جذور وقواعد سيقان نباتات الخيار	53
جدول رقم 10	يوضح اختبار القدرة الامراضية للفطريات المنتخبة باستخدام بذور اللهانة على وسط الاكار المائي (WA) مختبريا .	55
جدول رقم 11	النسبة المئوية للتثبيط لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد الفطرالممرض *Fusarium spp*	57
جدول رقم 12	النسبة المئوية للتثبيط لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد الفطرالممرض *Rhizoctonia sp*	58
جدول رقم 13	النسبة المئوية للتثبيط لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد الفطرالممرض *Pythium sp*	60
جدول رقم 14	النسبة المئوية للتثبيط لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد الفطرالممرض *Sclerotinia sp*	61
جدول رقم 15	المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد عزلة الفطر الممرض *Fusarium sp*	63
جدول رقم 16	المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد عزلة الفطر الممرض *Pythium sp*	64
جدول رقم 17	المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد عزلة الفطر الممرض *Rhizoctonia sp*	65
جدول رقم 18	دور عزلات الفطر *Trichoderma spp* في استحثاث المقاومة الجهازية في النبات ضد الفطر الممرض *Fusarium sp*	68
جدول رقم 19	دور عزلات الفطر *Trichoderma spp* في استحثاث المقاومة الجهازية في النبات ضد الفطر الممرض *Rhizoctonia sp*	69
جدول رقم 20	تـاثير راشـح عـزلات الفطـر *Trichoderma sp* فـي تثبـيط النمو القطري لعزلات الفطريات الممرضة	71
جدول رقم 21	التقـدير الكمـي والنـوعي لسـم Gliotoxin لعـزلات الفطـر *Trichoderma sp*	73
جدول رقم 22	التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *Trichoderma spp* باستخدام تحليل التتابع النيوكليوتيدي و GenBank Accession Number و Submission Number لها .	77
جدول رقم 23	مقارنـة بين نسب تشابه تتـابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلـــة الفطـــر (*Trichoderma viride Y.N.135.Shahad)* المعزولـة مـن محافظـة بغداد وبـين العـزلات الفطريـة الاخـرى لـنفس الفطـر المسـجلة عالميـا فـي المركـز الـوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	78
جدول رقم 24	مقارنـة بـين نسـب تشـابه تتـابع القواعـد النيوكلوتيديـة لمنطقـة الجـين SSU لعزلــة الفطــر *Trichoderma koningiopsis*	80

	(Y.N.136.Shahad) المعزولة من محافظة بغداد وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	
جدول رقم 25	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma harzianum* *(Y.N.137.Shahad)* المعزولة من محافظة الديوانية وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	81
جدول رقم 26	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma koningii* *(Y.N.138.Shahad)* المعزولة من محافظة الديوانية وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	83
جدول رقم 27	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma pseudokoningii* *(Y.N.139.Shahad)* المعزولة من محافظة بابل وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	84
جدول رقم 28	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma pseudokoningii* *(Y.N.140.Shahad)* المعزولة من محافظة الموصل وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	86
جدول رقم 29	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma reesei Y.N.141.Shahad)* المعزولة من محافظة الموصل وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	87
جدول رقم 30	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma koningiopsis* (Y.N.142.Shahad) المعزولة من محافظة الموصل وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	89
جدول رقم 31	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma harzianum* *(Y.N.143.Shahad)* المعزولة من محافظة الموصل وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	90
جدول رقم 32	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma reesei Y.N.144.Shahad)* المعزولة من محافظة النجف وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية	92

	(NCBI)	
جدول رقم 33	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma reesei Y.N.145.Shahad)* المعزولة من محافظة الموصل وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	93
جدول رقم 34	الخصائص الكيميائية للترب المعزول منها عزلات الفطر *Trichoderma sp*	96
جدول رقم 35	التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* ضد العزلة الفطر الممرض *Rhizoctonia sp* حقلياً في الاصص البلاستيكية .	98
جدول رقم 36	التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر Trichoderma ضد العزلة الفطر الممرض Fusarium sp حقلياً في الاصص البلاستيكية .	99
جدول رقم 37	التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* ضد العزلة الفطر الممرض *Pythium sp* حقلياً في الاصص البلاستيكية .	100

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
شكل رقم 1	القدرة الامراضية للفطريات الممرضة *Fusarium sp*، *Rhizoctonia sp* و*pythium sp* على الوسط الزرعي PDA بعد 7 ايام وبدرجة حرارة 25 ± 2م°.	54
شكل رقم 2	القدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp.* ضد الفطر الممرض *Fusarium sp*، *Rhizoctonia sp* و*pythium sp* على الوسط الزرعي PDA بعد 7 ايام وبدرجة حرارة 25 ± 2م°. و المقارنة (الفطر المقاوم *Trichoderma sp.* لوحدة).	56
شكل رقم 3	القدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp.* ضد الفطر الممرض *Fusarium sp*، *Rhizoctonia sp* و*pythium sp* حقلياً في الاصص البلاستيكية و المقارنة (الفطر المقاوم *Trichoderma sp.* فقط)	66
شكل رقم 4	تاثير راشح عزلة الفطر راشح T.B4. ضد الفطر الممرض *Fusarium sp*، *Rhizoctonia sp* على وسط PDA والمقارنة (الفطر الممرض لوحدة).	71
شكل رقم 5-أ	السم القياسي Gliotoxin	74
شكل رقم 5-ب	التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Gliotoxin لراشح العزلة الفطري T.M2	74
شكل رقم 5-جـ	التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Gliotoxin لراشح العزلة الفطري T.N4	75

شكل رقم 5-د	التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Gliotoxin لراشح العزلة الفطري T.H7	75
شكل رقم 6	شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma viride (Y.N.135.Shahad)*	79
شكل رقم 7	شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية (*Trichoderma koningiopsis Y.N.136.Shahad*)	80
شكل رقم 8	شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma harzianum Y.N.137.Shahad)*	82
شكل رقم 9	شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma koningii (Y.N.138.Shahad)*	83
شكل رقم 10	شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma (pseudokoningii Y.N.139.Shahad)*	85
شكل رقم 11	شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية(*Trichoderma (pseudokoningii Y.N.140.Shahad*	86
شكل رقم 12	شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma reesei (Y.N.141.Shahad)*	88
شكل رقم 13	شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma (koningiopsis Y.N.142.Shahad)*	89
شكل رقم 14	شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma harzianum Y.N.143.Shahad*	91
شكل رقم 15	شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma reesei (Y.N.144.Shahad)*	92
شكل رقم 16	شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma reesei (Y.N.145.Shahad)*	94
شكل رقم 17	اختبار التضاد الحيوي لعدد من عزلات الفطر *Trichoderma spp* المنتجة للسم الفطري الكليوتوكسين ومركبات الاستحثاث فيما بينها مختبريا على وسط PDA	97

1: المقدمة

ازداد الاهتمام بالمكافحة الاحيائية ضد مسببات امراض النبات المختلفة في الآونة الاخيرة كبديل عن استخدام المكافحة الكيميائية، وذلك لأنَّ استخدام المبيدات الكيميائية ملوثة للبيئة وقد تكون ضارة بالإنسان والحيوان، علاوة على ذلك فإن استخدامها المتكرر يعزز في تطوير سلالات جديدة مسببة للأمراض النباتية تكون مقاومة لتأثيرات المبيدات الكيميائية (Al-Obaidy, 2019) . اذ تم استخدام العديد من الاحياء الدقيقة التي تمتلك القدرة التضادية العالية ضد المسببات المرضية ، والتي تمتلك آليات مختلفة تستخدمها في المكافحة الاحيائية مثل التطفل المباشر على المسببات المرضة بعملية التطفل الفطري أو التنافس على العناصر الغذائية وتعطيل إنزيمات الممرض وإنتاج مركبات الايض الثانوية كالسموم الفطرية والمضادات الحيوية ، واستحثاث المقاومة الجهازية في النباتات (Silva، 2019) .

من بين أهم الاحياء الدقيقة المستخدمة في المكافحة الاحيائية انواع الفطر *Trichoderma* spp. بسبب نشاطه التضادي والعدائي ضد مجموعة واسعة من الكائنات المسببة للأمراض النباتية وتواجده بشكل واسع في غالبية أنواع الترب والبيئات المختلفة (Pimentel واخرون، 2020) . وهو من الفطريات حرة المعيشة إذ يوجد بصورة واسعة في التربة والنظم البيئية الجذرية ويتميز بارتباطه الوثيق بجذور النباتات ، وقدرته في تحسين نمو الجذور وتطورها وانتاجية المحاصيل ومقاومة الظروف البيئة المختلفة وامتصاص المغذيات (Ruangwong واخرون ،2021) .

يعد الفطر *Trichoderma* spp. من أهم الفطريات التابعة لعائلة Hypocreaceae ضمن قسم الفطريات الكيسية ، من الفطريات النشطة بايولوجياً ، اذ يعد *Trichoderma* spp. من الفطريات ذات الوظائف البيئية واسعة النطاق، والتي تحظى باهتمام كبير في البحث العلمي ، اذ تم توثيق ما يقارب 443 نوعًا مدرجًا في Mycobank Trichoderma (Lucking وآخرون ، 2020 و Hinterdobler واخرون ، 2021) اذ تُعرف أنواع *Trichoderma* spp. بقدرتها على إنتاج مركبات ايضية ثانوية نشطة بيولوجيًا ، بما في ذلك polyketides و alkaloids و terpenoids و peptaibols ، وغيرها اذ تنتج اكثر من 390 مركب غير متطاير من اكثر من 20 نوعًا معروفًا وأنواعًا مختلفة غير محددة (Li واخرون ، 2019) .

اذ يعد الفطر *Trichoderma* spp. من عوامل المكافحة الاحيائية الفعالة والصديقة للبيئة ورخيصة الثمن وقابليتها على البقاء والانتشار بشكل اوسع . وبنفس الوقت لها القدرة على تحطيم

المواد الكيميائية ذات الأثر الضار على البيئة ويعد مفتاح نجاح أنواع *Trichoderma* spp. في التربة هو نموها السريع وقدرتها التكاثرية العالية ، مما يساعدها على البقاء في ظل ظروف غير مناسبة ، وقدرتها على الاستفادة من العناصر الغذائية ومقاومة الفطريات المسببة للأمراض النباتية وإنتاج مستقلبات ثانوية أو مركبات مضادة للميكروبات ، وتحفيز الاستجابات الدفاعية في النباتات ، وتعزيز نمو النبات (عبيد و الجنابي، 2013 وGuzman-Guzman و اخرون ،2019 وCruz-Magalhaes واخرون ،2019 وRuangwong واخرون ،2021)

سجل اكثر من 35 نوعًا من *Trichoderma* spp. ضمن عوامل المكافحة الاحيائية على أساس الصفات المورفولوجية والجزيئية ومع ذلك فأن *T.harzianum* و *T.virens* و *T.viride* هي الأنواع الثلاثة الأكثر ذكرًا من *Trichoderma* spp. للتحكم البيولوجي في أمراض النبات وهي الأكثر استخدامًا في المكافحة البيولوجية وقد تم اثبات فعاليتها في السيطرة على مرض تعفن الجذور و الذبول والأمراض الورقية في العديد من المحاصيل وتم اثبات أنها تمنع عددًا من الفطريات التي تنقلها التربة مثل *Rhizoctonia* spp. , *Pythium* spp. , *Sclerotinia* spp. , *Fusarium* spp. , *Macrophomina* spp. ، وما إلى ذلك ومؤخرا اثبتت كفاءتها في السيطرة على نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. (Vinale واخرون، 2014 و Kumar واخرون ،2017 و Pimentel واخرون، 2020 و Misra وAnsari ،2021)

بعض انواع الفطر *Trichoderma* spp. لها القابلية على إنتاج مركبات الايض الثانوي مثل gliovirin و gliotoxin و viridin و viridol و koninginins و pyrones و peptaibols وغيرها ، والتي تتميز بقدرتها العالية في المكافحة الحيوية عن طريق إحداث موت الخلايا المبرمج في مسببات الأمراض الفطرية . فضلا عن اعتبارها من المضادات الحيوية المهمة لامتلاكها القدرة التضادية والتثبيطة لنمو المسببات المرضية . (Singh واخرون، 2018)

ومن بين اهم اليات المكافحة الاحيائية للفطر *Trichoderma* spp. هي استحثاث المقاومة الجهازية في النبات ، اذ تعد من الطرق الآمنة بيئياً في السيطرة على بعض امراض النبات وتعتمد هذه العوامل بشكل رئيس على التركيب الوراثي للنبات و نوع العامل الحيوي المستحث ، مما يؤدي الى تحفيز النبات على إنتاج عوامل المقاومة التركيبية أو البايوكيميائية أو كلاهما والتي عادة ما تكون جيناتها خامدة في النبات مثل جينات البروتينات المرتبطة بالامراضية والتي عند استحثاثها ينشط التعبير الجيني لها وبالتالي فان انتاج هذه العوامل سوف يثبط المسببات المرضية

ضمن ما يعرف بالمقاومة الجهازية المكتسبة ومن هذه البروتينات منها ما هو انزيمي مثل الكايتينيز chitinase والبروتنيز Protease والكلوكانيز glucanase والبيروكسيدزperoxide وبولي فينول اوكسيدز polyphenol oxides، التي درست بشكل مستفيض ، وأثبتت فعاليتها في مقاومة مسببات امراض النبات . ومنها ماهو غير انزيمي protein ومثبطات البروتيز والبروتينات المثبطة للرايبوسومات وبروتين Defensin والثايونين Thionin (Shoresh واخرون ،2010 وحسن و القيسي 2019 وDe Palma واخرون ، 2019 و Wang واخرون ، 2020) .

لذا هدفت الدراسة الى تقييم كفاءة عدد من عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* spp. والمعزولة من مناطق مختلفة من العراق على إنتاج السم الفطري Gliotoxin وكذلك دراسة امكانيتها في استحثاث المقاومة الجهازية بالنبات وإمكانية استخدام توليفة منها في السيطرة على المسببات المرضية والتشخيص الجزيئي لها ، اذ تمحورت هذه الدراسة حول الاتي :

المحور الاول : العزل والتشخيص : عزل عدد من عزلات الفطر *Trichoderma* spp. و تنقية هذه العزلات و اجراء التشخيص الاولي لهذه العزلات استنادا الى الصفات المظهرية .

المحور الثاني : الاختبارات التضادية : اختبار التضاد الحيوي لجميع هذه العزلات الفطرية على عدد من المسببات المرضية الفطرية للنباتات على الوسط زرعي PDA .

المحور الثالث : الكشف عن السموم الفطرية ودراسة تاثيراتها والكشف عن بعض المركبات المستحثة للمقاومة الجهازية للنبات ودراسة تاثيراتها في اكتساب النباتات صفات المقاومة ضد المسببات المرضية .

المحور الرابع : دراسة تقييم توليفة من عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسموم الفطرية والمنتجة للمركبات المستحثة للمقاومة ، في مكافحة مسببات امراض النبات المختلفة .

المحور الخامس : التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية المنتجة السم الفطري Gliotoxin والمركبات المستحثة لمقاومة النبات . بطريقة تحليل تتابع القواعد النتروجينية لهذه العزلات ومقارنة تسلسلاتها مع تسلسلات العزلات العالمية باستعمال برنامج BLAST .

2- مراجعة المصادر

2 -1: الفطر الاحيائي *Trichoderma* spp. تصنيفه وصفاته التصنيفية .

يصنف الفطر *Trichoderma* spp. سابقاً ضمن مجموعة تحت قسم الفطريات الناقصة (Deuteromycotina) ، اذ صنفه العالم Rifai عام 1969 ضمن الفطريات الناقصة وصف الفطريات Hyphomycetes ورتبة Moniliales وعائلة Moniliaceae ، ولكن بعد اكتشاف طوره الجنسي المتمثل بالجنس *Hypocrea* spp. ، صنف ضمن قسم الفطريات الكيسية Ascomycotina وصف Sordariomycetes رتبة Hypocreales وعائلة Hypocreaceae جنس *Hypocrea* spp. (Alexopoulus واخرون ، 1996) . ويكون التدرج التصنيفي للفطر استنادا للمصادر الحديثة في المركز الدولي لبنك الفطريات (www.mycobank.org) .

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Subphylum: Pezizomycotina
Class: Sordariomycetes
Subclass: Hypocreomycetidae
Order: Hypocreales
Family: Hypocreaceae
Genus: *Trichoderma* (*Hypocrea*)

يتميز طوره اللاجنسي بأهم الصفات التصنيفية تحت المجهر الضوئي بتكوين هيفات بيضاء الى بيضاء مصفرة ، مقسمة ومتفرعة ذات جدران ملساء، الحوامل الكونيدية مخروطية أو هرمية كثيرة التفرعات، تحمل الفياليدات ذات هيئة دورقية الشكل والتي تحمل بدورها الجراثيم الكونيدية ، تكون الحوامل الكونيدية متفرعة اذ تكون هرمية الشكل، تتميز هذه الحوامل بقصر طولها، خضراء اللون في النهايات الطرفية على خلاف القاعدة، أما الفياليدات تبدو متجمعة في هيئة باقة، كما سجل وجود الجراثيم الكلاميدية مؤلفة من كريات ملساء بينية أو نهائية في المستعمرات المتقدمة في السن. (Shrestha ، 2019)

تنمو مستعمراته بشكل سريع في البداية على الاوساط الزرعية وتكون ذات سطح ناعم ولون ابيض شفاف ، اذ يكون الثالوس شفافاً تقريباً ثم يصبحُ أبيضاً أو اخضراً مع تقدم عمر المستعمرة

الفطرية كذلك وجود كتل زغبية متناثرة ذات لون أخضر تتكون من الجراثيم و تكون بيضوية الشكل ، تتبعه هايفات هوائية تتطور عليها الابواغ الكونيدية والتي تكون في البداية بيضاء مخضرة ثم تتحول الى خضراء براقة ثم تصبح اشد خضرة الهايفات مقسمة ومتفرعة ذات سطح املس عديمة اللون قطرها يتراوح بين (1.5-3.0) مايكرون الحوامل الكونيدية الرئيسة قطرها 4.5 مايكرون وتنتج حواملاً جانبية عديدة هذه التفرعات قد تكون مفردة ولكن في الاغلب تكون بشكل مجموعات (Rifai ، 1969) .

2-2 : مجالات استخدام الفطر *Trichoderma* spp. .

تعد انواع الفطر *Trichoderma* spp. كأحد عوامل التحكم البيولوجي المتنوعة وبالوقت نفسه منخفضة التكلفة وفعالة وصديقة للبيئة. تمتلك القدرة على الاستدامة والاستمرار في الأنظمة الحيوية المختلفة، اذ يكون لها تأثيراً ضئيلاً على توازن التربة ولا تضر بالكائنات الحية المفيدة التي تسهم في السيطرة على مسببات الأمراض. (Kareem وAl-Araji ، 2017) اذ تحتوي منتجات *Trichoderma* spp. على مجموعة متنوعة من الاستخدامات في مجالات البيئة والصحة وحتى الصناعة وغيرها (Woo و اخرون 2014 و Silva ، 2019) ودورها بالارتباط التكافلي مع النباتات ادى إلى اكتساب مقاومة النبات ضد مسببات امراض النبات ، وتحسين العمليات التنموية للنباتات ويعزز امتصاص المغذيات وغيرها (Silletti واخرون ، 2021) إذ يعد إنتاج المضادات الحيوية والمنافسة والتطفل الفطري ودعم وتعزيز نمو النباتات والتي يتضمن تحفيز كل عملية التخليق الحيوي للمستقلبات المستهدفة مثل منظمات نمو النبات والإنزيمات و Siderophores وغيرها من بين اهم السمات الرئيسة التي تتميز بها انواع الفطر *Thrichoderma* spp. (Shrestha ، 2019) وبالتالي منع أو إعاقة نمو المسببات المرضية والسيطرة عليها فإن الأدلة المقدمة في هذه الدراسة تدعم وبقوة إمكانية استخدام انواع الفطر *Thrichoderma* spp. كعوامل تحكم بيولوجي آمنة وصديقة للبيئة وفعالة لأنواع المحاصيل الزراعية المختلفة . (Sood، 2020)

2-2-1: المكافحة الاحيائية لمسببات امراض النبات .

تعد المكافحة الاحيائية بالعوامل الميكروبية طريقةً بديلة للسيطرة على أمراض النبات وتعد أنواع *Trichoderma* spp. واحدة من اهم عوامل المكافحة الاحيائية الفطرية الجيدة في قمع مسببات الأمراض خاصة تلك التي تنتقل عن طريق التربة. (Zhang, 2018) اذ يعد جنس

Trichoderma spp. من اهم الفطريات المستعملة في المكافحة الاحيائية لما له من قدرة على تثبيط نمو الفطريات الممرضة للنبات وذلك باستخدام اليات مختلفة مثل التطفل الفطري والتنافس على المكان والغذاء وإنتاج المواد المضادة للفطريات . (Verma واخرون 2007 و Kaewchai ، 2009 و سعاد، 2011)

تمت دراسة فطر *Trichoderma* spp. على نطاق واسع ضد مسببات الأمراض النباتية المختلفة نظرًا لقدرته على تقليل عدد مسببات الأمراض النباتية التي تنقلها التربة بما في ذلك *Fusarium* spp. و*Rhizochtonia* spp. و *Pythium* spp. و *Phytophthora* spp. وغيرها التي تسبب امراض نباتية خطيرة على عوائل نباتية مختلفة بالنظر إلى نتائج البحوث الحديثة ، ويمكن الاستنتاج أن أنواع *Trichoderma* spp. لها خاصية معادية في السيطرة على هذه المسببات (Kareem وAl-Araji ، 2017و Inovejas و Divina، 2018 والخفاجي، 2020)

2-2-2: استحثاث المقاومة ضد مسببات امراض النبات.

عُرفت انواع الفطر *Trichoderma* spp. منذ عشرينيات القرن الماضي على الأقل لقدرتها على العمل كعوامل للمكافحة الحيوية ضد مسببات أمراض النبات، حتى وقت قريب كان يُفترض أن الآليات الرئيسة للسيطرة هي تلك التي تعمل بشكل أساس على مسببات الأمراض وتشمل التطفل الفطري والتضاد والتنافس على الموارد والفضاء، بينما اظهرت الدراسات اللاحقة أن تأثيرات الفطر *Trichoderma* spp. كبيرة جدا على النباتات ، بما في ذلك استحثاث المقاومة الجهازية أو الموضعية ضد مسببات امراض النبات ، اذ تستعمر هذه الفطريات الجذور الشعرية والطبقات القشرية الخارجية وتطلق المركبات والجزيئات النشطة بيولوجيًا التي تسبب في تحفيز النباتات على إنتاج بعض المركبات أو زيادة بتراكيزها والتي تؤدي الى تكوين بعض التغيرات الخلوية أو التركيبية ضد مسببات امراض النبات ، فضلا عن تحريض مسارات المقاومة في النباتات ، قد يحدث زيادة في نمو النبات وامتصاص المغذيات ، وانتاج مزيجًا غنيًا من الإنزيمات المضادة والمركبات المحفزة للمقاومة بما في ذلك chitinases and β-1,3 glucanases. (Harman، 2006)

تعد عملية استحثاث المقاومة في النبات واحدة من اهم المجالات الحديثة في استخدام الفطر *Trichoderma* spp. حيث نالت اهتمام الكثير من الباحثين (الخفاجي، 2020) اذ ينتج فطر

Trichoderma spp. مركبات تحفز آليات دفاعية في النبات لقدرته على تحفيز النمو وتحفيز المقاومة الجهازية في النبات (Andhare واخرون، 2019) . كما تم تقييم إنتاج chitinase لسلالة *Trichoderma* spp. باستخدام طريقة Somogyi-Nelson اللونية لتحديد قدرة المكافحة الاحيائية لهذه الخلايا الداخلية. علاوة على ذلك ، تم تقييم قدرة تعزيز نمو النبات على بذور الطماطة. اثبت أن *Trichoderma* spp. كان قادرًا على غزو وتقليل نمو مسببات الأمراض النباتية ، التي أنتجت chitinase وأدت إلى تعزيز النمو واستحثاث المقاومة ضد المسببات المرضية . (Lopez واخرون، 2020)

2-2-3: انتاج المركبات الشبيهة بمنظمات النمو النباتية .

هنالك دور إيجابي كبير لفطريات *Trichoderma* spp. في تدعيم وتعزيز نمو النبات وزيادة نسبة الانبات والانتاج ، إذ إنَّ الدراسات الحديثة اكدت بأنَّ لهذه الفطريات دوراً في زيادة قابلية النباتات على النمو وتحسين جاهزية العناصر الغذائية وبالتالي زيادة الإنتاج و أنَّ لبعض عزلات الفطر *Trichoderma* spp. تأثيراً محفزاً لنمو النباتات بسبب افراز منظمات نمو نباتية شبيه بالاوكسينات والجبرلينات تعمل بالتوافق مع زيادة جاهزية وامتصاص العناصر الغذائية فضلا عن قدرته على مكافحة مختلف المسببات المرضية الفطرية التي تصيب النبات (سهيل، 2013) كما ذكر Benitez، وجماعته 2004 أنَّ عزلات الفطر *Trichoderma* spp. تنتج السايتوكاينين مثل zeatin و GA 3 ، وان السيطرة على إنتاج هذه المركبات يمكن أنْ يحسن من السماد الحيوي المنتج وكذلك تصنيع الهرمونات النباتية . (Osiewacz ، 2002)

2-2-4 : استخدام مركبات الايض الثانوي في صناعة الادوية .

تعد أنواع الفطر *Trichoderma* spp. من بين اكثر الفطريات انتشارا في البيئة وفي جميع أنحاء العالم ويمكن بانتشارها هذا أنْ تكون قريبة التماس مع الكائنات الحية اذ يمكن أن يكون لهذه الفطريات تأثيرات إيجابية وسلبية على هذه الكائنات ، اعتمادًا على النوع *Trichoderma* sp. اذ يمكن أنْ تكون بعض مركبات الايض الثانوي هذه مستقلبات أدوية أو سمومًا أو كليهما فعلى سبيل المثال ، يعد السم Gliotoxin ، أول مضاد حيوي تم اكتشافه من فطر *Trichoderma* spp. كان يستخدم كدواء ضد العديد من المسببات المرضية (البكتريا والفطريات) (Mukherjee واخرون 2013 و Silva، 2019) وبالوقت نفسه السموم الفطرية قادرة أيضا على احداث المرض

والموت للانسان والحيوانات عند التعرض لها بجرعات كبيرة من خلال الابتلاع والاستنشاق اوالتعرض الجلدي كما سجلت مادة ال Dermodin بوصفها مضاداً حيوياً ينتجه الفطر *Trichoderma* spp. لمدى واسع من البكتريا والفطريات (Etzel، 2002) .

2-2-5 : استخدامها في مكافحة الحشرات .

تم استخدام انواع عديدة من الفطر *Trichoderma* spp. ورواشحها الفطرية ضد بعض الحشرات ، مثل حشرة المن كحشرات إختبارية لأداء نشاط المبيدات الحشرية التي يدخل في تركيبها الفطر *Trichoderma* spp. ، إذ أظهرت نشاطًا قويًا ضد هذه الحشرات ، اذ كشفت هذه الدراسة التجريبية أن المستخلص الكحولي الذي تم الحصول عليه من *T. harzianum* يحتوي على مركبات مفيدة يمكن استخدامها في تطوير مبيدات الفطريات ومبيدات الآفات الحشرية لتحسين القطاع الزراعي في البلاد (Begum و اخرون ، 2018) وفي دراسات اخرى تم عمل مستخلصات مائية للفطر *T. harzianum* و *T. viride* ودراسة تاثيرها ضد آفة خنفساء الحبوب الشعرية اذ كان له تأثير واضح في خفض نسبة الفقد في وزن الحبوب واختزال اعداد الافة (بنيان و خلف ، 2017) .

2-2-6: يدخل ضمن تصنيع المبيدات الزراعية (او تحسين صفات المبيد) .

تمكن عدد من الباحثين مثل Harman و اخرون، (2004) و Ruocco و اخرون ، (2009) و Montealegre و اخرون، (2010) ، بإنتاج العديد من المبيدات الحيوية المنتجة من الفطر *Trichoderma spp.* التي اثبتت كفاءتها العالية في حماية الكثير من النباتات من مسببات الامراض وتحفيز نمو النبات وغيرها . كما أظهرت نتائج Ahmid و Ismail ، (2020) فاعلية المبيد الاحيائي التريكوزون ميدانياً في تثبيط العديد من الامراض النباتية مثل مرض التعفن الفحمي على نبات البطيخ الناجم عن الفطر الممرض *M.phaseolina*. و قد قارن Silvia ،(2021) في دراسة اجراها على المبيد الحيوي المصنع من الفطر *Trichoderma asperellum* في السيطرة على مرض تعفن الساق على الحمضيات (Citrus maxima) التي تسببها *Botryodiplodia theobromae* اذ أظهرت النتائج أن المبيد الحيوي للفطر *Trichoderma* كان له قدرة أعلى في قمع هجوم المسببات الممرضة الذي كان قادرًا على شفاء الجروح المتعفنة على السيقان المتأثرة بنسبة 41.95٪ و 26.74٪ على التوالي وكذلك في دراسة

اخرى أظهرت النتائج ان المبيد الحيوي للفطر *Trichoderma* spp. أعطت أفضل تأثير في السيطرة على مرض اللفحة الورقية على الذرة الذي يسببه فطر *Helmintosporium turcicum*. (Wiranata و Tantiani, ،2021) .

أجريت تجربة ميدانية (العراق ، محافظة أربيل) تحت ظروف البيوت البلاستيكية لتقييم فعالية التركيبة العضوية الجديدة حسب الجرعات الموصى بها من المبيد Trichozone ، مقارنة مع مبيد النيماتودا الكيميائي القياسي (Aminoforacarb) على نيماتودا تعقد الجذر *Meloidogyne* spp. على محصول الباذنجان تحت ظروف قياسية وتبين انه يمكن أن يؤدي استخدام هذه التركيبة العضوية المختبرة من Trichozone الى ظهور نتائج جيدة بالسيطرة على المرض ضمن الجرعات الموصى بها ، وتقديم بدائل جيدة وفعالة ومنخفضة التكلفة نسبيًا لمبيدات النيماتودا الكيميائية اذ أدت الى تحسين الحاصل وجودته وكذلك صحة الإنسان و الحفاظ على البيئة.(Zewain واخرون ،2019) .

2-2-7: يستخدم في التحطيم الحيوي للمبيدات الكيميائية .

أدى الوعي البيئي إلى تطوير تدابير تنظيمية تهدف إلى تصحيح أخطاء الماضي وحماية البيئة من التلوث والاستغلال في المستقبل ومع ذلك فإن الكثير من الاهتمام والبحث من أجل تنظيف فعال للمواقع الملوثة بالكيمياويات ، ولكل تقنية مطورة مزاياها وقيودها في معالجة الملوثات ، اذ تعتبر المعالجة البيولوجية بالميكروبات من التقنيات المبتكرة التي لديها القدرة على التخفيف من العديد من مشاكل التلوث البيئي، فإن استخدام الفطريات في المعالجة البيولوجية جيدً وان الجنس *Trichoderma* يمتلك القدرة على تحليل مجموعة من الملوثات غير التقليدية بما في ذلك المعادن الثقيلة ومبيدات الآفات والهيدروكربونات العطرية المتعددة (Andhare واخرون ،2019)

وأشار Afify واخرون 2013 الى إمكانية تحفيز الفطر *Trichoderma* spp. لتحليل مبيد الافات Oxamyl اذ تم تحديد سلالات فطرية قادرة على التحلل الحيوي لمبيد Oxamyl مثل *T.viride* و *T.harzianum* اشارت النتائج الى أنَّ *Trichoderma* spp يستخدم Oxamyl كمصدر للكاربون والنتروجين ويمتلك الانزيم الذي يعمل على رابطة الاميد والاستر في هيكل Oxamyl وادت الى تحلل Oxamyl 72.5 % خلال 10 أيام من المعاملة بسلالة *T.harzianum* و 82.05% عند المعاملة بسلالة *T.viride* هذا يشير الى أنَّ عزلات *Trichoderma* spp. تكون مفيدة للمعالجة البايلوجية ضد المبيد Oxamyl .

8-2-2 : يستخدم في الصناعات المختلفة .

أصبح استخدام الكائنات الحية الدقيقة من الاهتمامات الرئيسية في الصناعات، اذ أدى ذلك الى البحث عن تقنيات ومركبات وعمليات صديقة للبيئة اذ يتم استخدامها في أنواع مختلفة مثل صناعة الوقود الحيوي ، كمنتج للإنزيمات والمواد الكيميائية ،و في صناعة المواد الغذائية ، وفي صناعة اللب والورق ، وصناعة النسيج وفي التكنولوجيا الحيوية كمنتج للجسيمات النانوية ، وإنَّ منتج السليلاز الرئيس من جنس *Trichoderma* spp. هو *Trichoderma viride* (Schuster وSchmoll، 2010 و Silva، 2019) .

3-2 : دور الفطر الاحيائي *Trichoderma* spp. في المكافحة الاحيائية .

كان استخدام عوامل المكافحة الاحيائية ضروريًا كبديل للاستخدام المكثف لمبيدات الآفات الكيميائية علاوة على ذلك فإن استخدام هذه العوامل بدلاً من مبيدات الآفات الكيميائية له مزايا أخرى خاصة للإدارة البيئية المستدامة والصحة العامة (Shrestha ، 2019) . تعتمد المكافحة الاحيائية على استخدام الطفيليات أو المفترسات أو مسببات الأمراض من أجل التحكم في نشاط الكائنات المسببة للأمراض الأخرى (Silva، 2019) .

تعد المكافحة البيولوجية بالمضادات الميكروبية طريقة بديلة للسيطرة على أمراض النبات وتعد أنواع *Trichoderma* spp. واحدة من اهم عوامل المكافحة الحيوية الفطرية المناسبة في قمع مسببات الأمراض التي تنقلها التربة (Zhang واخرون ،2018) اذ يعد جنس *Trichoderma* spp. من أهم الفطريات المستعملة في المكافحة الاحيائية لما له من قدرة على تثبيط الفطريات الممرضة للنبات وذلك باستخدام آليات مختلفة وهي التطفل الفطري والتنافس على المكان والغذاء وإنتاج المواد المضادة للفطريات (Kaewchai، 2009 و سعاد، 2011)

تمت دراسة هذه العوامل في المكافحة الاحيائية على نطاق واسع ضد مسببات الأمراض النباتية نظرًا لقدرتها على تقليل عدد مسببات الأمراض النباتية بما في ذلك *Fusarium* sp. و *Rizochtonia* sp و *Pythium* spp. وغيرها ، والتي تسبب امراضَ الذبول وموت البادرات في الكثير من النباتات (Inovejas و Divina ، 2018).

درس كل من Sumida واخرون (2018) إمكانية *Trichoderma asperelloides* كعامل للمكافحة الحيوية تجاه مرض العفن الأبيض على محاصيل فول الصويا فقد اظهرت النتائج أنَّ العزلة *T. asperelloides* المختبرة كانت أكثر كفاءة في التحكم في العفن الأبيض من اثنتين من المنتجات التجارية المصنعة وان *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma asperelloides* كانت الأفضل في القدرة على التحكم البيولوجي في مرض العفن الأبيض لمحاصيل فول الصويا في الحقل .

أكدَّ Das واخرون ،(2019) بأنَّ أنواع الفطر *Trichoderma* spp. من محتويات المحيط الجذري إذ تستعمر الجذور لتوفير الحماية للنبات ضد المسببات المرضية المختلفة ، كما تستخدم بعض انواع الفطر *Trichoderma* spp. آلية Mycoparasitism و هي من أكثر الآليات التي يلازمها انتاج الانزيمات المحللة للجدار الخلوي الخاص بمسببات المرضية ومنها الفطر T. harzianum و *T.virens* وكانت فعالة في السيطرة على مسببات أمراض كثيرة منها امراض الفلفل الأسود والهيل والزنجبيل وغيرها، بينما كشفت الدراسة التي اجراها deIta واخرون (2020) أنَّ *T. harzianum* يثبط الحد الأقصى لنمو شعاعي بنسبة 68٪ للفطر *Fusarium* sp. والفطر *T.hamatum* يثبط الحد الأقصى للنمو الشعاعي 71.6 و 73.8٪ من *Colletotrichum* sp. و *Pythium* sp على التوالي .

تم استخدام النوع *T.afroharzianum* للسيطرة على أمراض النبات ، مثل البقع البنية في الأرز والأمراض التي تسببها *Ph.erystroseptica* و *Fusarium* sp. و *Rh.solani* في نباتات الطماطة والبطاطا و يستخدم هذا الفطر على نطاق واسع ضد العديد من الفطريات المسببة للأمراض النباتية ، مثل *Rh.solani* ، وضد العديد من أمراض الجذور والشتلات التي تنتقل عن طريق التربة (Silva، 2019)

ومن اهم الآليات التي يستخدمها الفطر *Trichoderma* spp. في المكافحة الاحيائية

2-3-1 : المضادات الحياتية Antibiotics .

يعرف التضاد الحيوي بأنه تثبيط إحدى الكائنات بوساطة ناتج أيضي لكائن آخر. اذ تمكن Weindling و Emerson (1936) لأول مرة من عزل مادة سامة من راشح الفطر

Trichoderma sp ذات تأثير سام للفطر *Rh.solani* إذ احتوى الراشح على المضادين الحيويين Suzukcillin و Alamethacin ، وتشير الدراسات إلى أن الفطر *T.viride* ينتج المركب الحيوي Gliotoxin الذي يعمل على تثبيط أبواغ الفطر .*Fusarium* spp والعديد من الفطريات الاخرى ، أستعمل الفطر *Trichoderma* في مكافحة العديد من الفطريات الممرضة للنبات إذ أشارت الدراسات إلى قدرة إفرازات الفطر *Trichoderma* على اختزال النمو القطري للعديد من الفطريات الممرضة مثل *F.oxysporum* و *F.culmorum* و*F.moniliforme* و*Rh.solani* و *Sclerotinia sclerotiorum* وتعزى هذه التأثيرات إلى قدرة الفطر على إنتاج المضادات الحيوية مثل Trichodermol وTrichodermin وGliotoxin وviridin وPachybas وChrysophancol Emodin (Singh واخرون ، 2018 و Misra و Ansari، 2021) .

2-3-2 : الإنزيمات Enzymes .

أثبتت الدراسات قدرة .*Trichoderma* spp على انتاج العديد من الانزيمات مثل Cellulases , Cellobiases التي تحول السليلوز إلى كلوكوز (Carsolio وآخرون ، 1999) (Szengyel وآخرون ، 2000) كذلك تعزى قدرة أنواع الفطر *Trichoderma* في اختزال النمو الفطري لعددٍ من الفطريات الممرضة مثل *F.oxysporum* و *F.culmorum* و*F.moniliforme* و*R.solani* (Kuguk و Kivang، 2002) ، هناك إنزيمات محللة للكايتين يفرزها الفطر *T.harzianum* تتضمن Exochitinases , Endochitinases التي تنتج خلال نمو الفطر في الوسط السائل الحاوي على الكايتين وهو مصدر الكاربون (Delacruz وآخرون ، 1992 و Haran وآخرون ، 1996) . وبما أن المركب β-1,3- glucanase يدخل في تركيب جدار الخلية الفطرية فقد سجل كأهم إنزيم في المقاومة الأحيائية للكائنات الدقيقة وزيادة على الكايتين والكلوكان فان جدار الخيوط الفطرية يحوي على بروتينات فإن إنتاج أنزيم Protease قد يؤثر في التضاد الأحيائي (Flores وآخرون ، 1997) .

2-3-3 : التطفـــــــــل الفطري Mycoparasitism .

إن التطفل الفطري هي عملية تغذي أو إعتماد فطر على فطر آخر في حصوله على احتياجاته الغذائية ، إذ إن أقطار خيوط الفطر*T.harzianum* تتراوح بين 1.5-3.0 مايكرون بينما هايفات الفطريات الممرضة تتراوح بين 5-7 مايكرون ، ولذلك يمكن تمييزها بوضوح ، وإن تداخل

فطر المقاومة الأحيائية مع الفطر الممرض يكون تدريجياً ، اذ ينمو بموازاة الفطر الممرض ثم يلامس خيوطه بعدها تلتف خيوط الفطر المقاوم بشكل ملف حلزوني حول خيوط الفطر الممرض ، ثم يرسل خيوطاً لها نهايات مدببة تخترق غزل الفطر المضيف ، ثم يحلل جدرانه من خلال إفراز إنزيمات Cellulase ، Chitinase وβ-1-3-glucanase ، أو يرسل ممصات أو خطاطيف أو أعضاء التصاق (Markovick و Kononov ، 2003) تمتلك بعض عزلات الفطر *T. harzianum* قدرة تطفلية عالية من خلال إلالتفاف حول الغزل الفطري للفطر الممرض وتحليل جدران خلاياه بالإنزيمات المرافقة للاختراق يظهر الغزل الفطري للفطر *T.harzianum* بأشكال متعددة عند تطفله كالخيوط اللولبية أو أعضاء التصاق ، اذ يتطفل الفطر على أنواع عديدة من أجناس الفطريات المرضية مثل : *Rhizoctonia* و *Fusicladiun,* و *Seclerotina* و *Rhizopus* و*Helminthosporium* (Aziz وآخرون ، 1993) .

2-3 -4: التنـــافس Competition .

إن التنافس على الغذاء والمكان بين المسببات المرضية والكائنات غير المرضية هي آلية مهمة في المقاومة الأحيائية ضد الممرضات النباتية (الحيدري ، 2007). كما أشار Sivan و Chet ، 1989 إلى أن العزلة T-35 للفطر*T.harzianum* ثبطت وبشكل ملحوظ نسبة إنبات الأبواغ الكلاميدية للفطريات *F.oxysporum f.sp.vasinfectum* و *F.oxysporum, f.sp.melonis* المسببين للذبول الفيوزرمي للقطن و البطيخ على التوالي بسبب المنافسة على Glucose و Asparagin اللذان يحتاجهما الفطران لإنبات الأبواغ الكلاميدية كما أن الفطر يمتلك قدرة تنافسية عالية بسبب سرعة نموه وقدرته العالية على التجرثم وإحتلال مواقع الممرضات ، أو يعمل على إزالتها بتكوين مستعمرات ثانوية (Elad وKapart، 1999) .

2-3-5 : إستحثاث المقاومة الجهازية Induced Systemic Resistance .

عرفت المقاومة المستحثة بأنها المقاومة التي تستحث أو تحدث بعد التلقيح بمسبب مرضي أو مسبب غير مرضي أو معاملة النبات بأحد النواتج الأيضية للمسبب إذ تتكون دفاعات فيزياوية أو كيموحيوية في نسيج العائل ، و ان عزلات الفطر *Trichoderma* spp. قادرة على إستحثاث المقاومة الجهازية من خلال زيادة فعالية أنزيم البيروكسديز (Agrios، 2005) تتحفز دفاعات النبات عند تعرضها الى مسببات خارجية حية أو غير حية بإنتاج الفايتوالكسين phytoalexin فضلاً عن إنتاج اللكنين Lignin والسوبرينSubren ، والكايتوسان حيث له القدرة على استحثاث

المقاومة في نباتات الطماطة ضد مرض الذبول الفيوزارمي اذ ظهرت فعالية الرش بالكايتوسان مرتين (عند التلويث وبعد أسبوع منه) أفضل مستوى من الاستحثاث (عبود ،1989).

6-3-2 : تثبيط إنزيمات الفـطر الممرض . inhibition of pathogenic fungi enzymes

يعمل فطر المقاومة الأحيائية على كبح عمل إنزيمات الفطر الممرض للنبات والمتمثلة بالإنزيمات المحللة لخلايا جدار العائل النباتي وإحداث الإصابة ، اذ وجد Puckhaber وآخرون (2002) أن الفطر *Trichoderma* spp. له القدرة على حماية نبات القطن من الإصابة بالفطر الممرض *Rh.solani* من خلال قدرته على إنتاج المركب الأيضي Gossypol الذي يعد مركباً قاتلاً للمسبب المرضي تعمل آلية تثبيط الإنزيمات من خلال إفراز الفطر *T. harzianum* لبعض الإنزيمات إلى بيئة المسبب المرضي مما يؤدي إلى تعطيل الإنزيمات التي لها اثر كبير في تثبيط قابلية المسبب المرضي *Botrytis cinerea* على تحليل خلايا العائل النباتي بفعل إنزيماته وإحداث الإصابة (Elad و Kapat ، 1999).

4-2: أنواع *Trichoderma* spp. المستخدمة في المجالات الزراعية في العراق .

اختبرالعامري واخرون (2018) القدرة التضادية لفطر *T.harzianum* والذي تميز بكفاءة تضادية عالية ضد الفطريات الممرضة اذ وصلت درجة التضاد الى 2 لكل من الممرضات النباتية حسب مقياس Bell . بينما أكد Sulaiman وYouns(2019) أنَّ لعزلة الفطر *T. harzianum* كفاءة عالية في تثبيط نمو الممرض *Sclerotinia sclerotiorum* اذ أعطت درجة تضاد 1 ضمن مقياس Bell فضلا عن باقي العوامل الاحيائية المختبرة *T.viride* و *T.ressei* التي اظهرت درجة تضاد 2 بينما الفطر *T.longibrachium* أعطى قدرة تطفلية ضعيفة ضد الفطريات الممرضة .

في حين اثبت مطرود، (2018) كفاءة الفطر *T.koningii* في جاهزية عنصر الفسفور المهم للنبات في الأوساط السائلة خلال فترات تحضين مختلفة مقارنة بمعاملة المقارنة وبينت نتائج الكشف عن وجود مركبات كيميائية مختلفة في راشح الفطر تعمل في استحثاث المقاومة الجهازية للنباتات ضد المسببات الفطرية. وأوضح الاسدي (2020) أنَّ جميع عزلات الفطر *Trichoderma* spp. كان لها تاثيرٌ معنوي في تثبيط عزلات الفطر الممرض

Fusarium.brachygibbosum قياساً بمعاملة المقارنة واثبتت عزلة الفطر *T.asperelloides*. كفاءة عالية في تثبيط نمو الفطر الممرض .

كما اجريت دراسة اخرى هدفت إلى تقييم فاعلية بعض المواد البوليميرية المنتجة من الفطر *T. longibrachiatum* كمبيدات فطريات حيوية ضد العديد من الممرضات النباتية (Mahde واخرون ، 2019) و تمت دراسة الظروف البيئية الضرورية لإنتاج Chitinase و 1-3 β glucanase من الفطر *T.fertile* أظهرت النتائج أنه أعطى أعلى إنتاجية لكلا الإنزيمين (الغانمي و حيدر، 2012) تم إنتاج Xylanase بواسطة *T.hamatum* /لمعزول من التربة في حالة التخمير الصلبة باستخدام قش القمح وقشور الأرز كركيزة زراعية شائعة ورخيصة (فرج واخرون ،2017) وإنتاج Polygalacturonase (PG) و Polygalacturonase Transeliminase (PGT) و Carboxy methyl cellulase (CMCase) من *T.pseudokomngii* (Al-Hamdany ، 2008) وقد درس لطيف (2010) اختبار تأثير الراشح الطافي للفطر *T.harzianum* على حشرة Khabra insect .

اظهرت النتائج فعالية جيدة للفطر *T. harzianum* في صفات النمو لبادرات نخيل التمر اذ اجري بحث لمعرفة تأثير التلقيح بالفطر *T.harzianum* في صفات النمو لبادرات نخيل التمر صنف البرحي وقد بينت نتائج التجربة الى أنَّ التلقيح بالفطر *T.harzianum* ادى الى حصول زيادة معنوية في صفات النمو(ارتفاع المجموع الخضري وطول المجموع الجذري، الوزن الطري والجاف لمجموع الخضري والجذري)(علاء واخرون ،2019) .

أشارت النتائج التجريبية إلى أن تلقيح *Trichoderma* spp. كان له تأثيرٌ معنوي في زيادة توافر العناصر الكبرى NPK في التربة مقارنة بالمعاملات الأخرى اذ بلغ محصول حبوب الذرة *zea mays L* (2.9533، 2.9533,0.4000 كغم) من الأسمدة الحيوية البكتيرية والفطرية والأسمدة البوتاسية على التوالي قياسا مع مع معاملة المقارنة. (Aajmi و Kamal ، 2019)

2-5: مركبات الايض الثانوي المنتجة من قبل بعض أنواع *Trichoderma* spp. .

تعد مركبات الايض الثانوي مركبات كيمائية مختلفة في درجة تعقيدها وتوجدها في النباتات نتيجة الفعاليات الايضية المختلفة (عبيد والجنابي ، 2013) .تنتج انواع الفطر *Trichoderma* spp. العديد مركبات الايض الثانوي منها المضادات الحيوية مثل gilotoxin و virindin و trichodermine ، والتي ثبت أن لها نشاطًا مضادًا للفطريات للسيطرة على مسببات الأمراض المختلفة التي تنتقل عن طريق التربة مثل *R.solani* و *Pythium* spp. و *Fusarium* spp.و

S. fsiietc. يستخدم *Trichoderma* spp. المادة العضوية في المناطق المجاورة للجذر كمصدر للغذاء ويستمر في النمو لفترة من الزمن ، تعمل *Trichoderma* spp. على تسريع تحلل المواد العضوية ، وتذيب المعادن غير القابلة للذوبان وتلتقط العناصر الغذائية مثل الفوسفور والحديد والعناصر الأخرى المرتبطة بإحكام وتنتج الكثير من مركبات الايض الثانوي المختلفة .

ينتج الفطر *Trichoderma* spp. مجموعة من المضادات الحيوية وتتمثل في butenolide ، Harzianolide ، Trichorzianines، Harzianopyridone والتي تؤثر على العديد من الفطريات الممرضة، اذ تتميز المضادات الحيوية التي ينتجها هذا الفطر بانها مضادات حيوية طيارة مثل 6- pentyl-α-pyrone ومعظم مشتقات Isocyanide اذ تتداخل هذه المضادات الحيوية مع فوسفوليبيدات الغشاء البلازمي و بالتالي تغيير المبادلات مع الوسط الخارجي، كما أن لها دوراً في استحداث مقاومة النبات (Tomah و اخرون ، 2020) .

يضم جنس *Trichoderma* spp. العديد من أنواع الفطريات الشائعة المنتشرة في جميع أنحاء العالم و تعد أنواع *Trichoderma* spp. منتجة معروفة للمستقلبات الثانوية مع مجموعة متنوعة من الأنشطة الاحيائية، فقد تلعب المستقلبات الثانوية دورًا محوريًا في الأنشطة العدائية لبعض أنواع المكافحة الاحيائية من *Trichoderma* spp. ، إذ استخدم *T. harzianum* سابقًا كعامل تحكم بيولوجي ضد مسببات الأمراض المختلفة ، وتم دراسة تأثير هذه المستقلبات الثانوية *للفطر T. harzianums* ضد العديد من المسببات المرضية فأظهرت قدرات متباينة ضد هذه المسببات، تم استخدام العديد من التقانات الحديثة للكشف عن هذه المستقلبات ، منها تقنيات كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)، والتحليل الطيفي الكتلي اللوني السائل (LC / MS)، وتقنيات الرنين المغناطيسي النووي (NMR) لتحديد المستقلبات الثانوية الرئيسية، فقد اظهرت توصيف وتقدير كمية 6--n pentyl-6H pyran-2-one (6PP) وحمض harzianic (HA) ، التي يمكن استخدامها في المستقبل في دراسات التعبير الجيني المختلفة وسوف تساعد في استخدامها كسماد حيوي في مجال المكافحة الاحيائية (Nosir, 2019) .

درس Dwivedi و Prasad (2016) مركبات الايض الثانوي كمضادات حيوية من قبل الفطريات *T.harzianum* و*T.viride* و*Gliocladium virens* التي تمنع امراض تعفن الجذور ، وتعفن الساق ، والذبول ، وغيرها من الأمراض التي تسببها *Sclerotium rolfsii* و *Macrophomina phaseolina* و *Rh.solani* و *Fusarium* sp. و *Pythium debarianum* و قد تبين أن المركبات المنتجة من الفطرين *T.harzianum* و *T.hamatum*

كانا أكثر فاعلية ضد *Sclerotium rolfsii* ومثبطان لنمو الفطريات بنسبة 79٪ لأنها تنتج مركبات من المضادات الحيوية مثل Viridin و gliotoxin و glioviridin و dermin و trichodermin .

6-2: دور السموم الفطرية المنتجة من قبل انواع الفطر *Trichoderma* spp. في السيطرة على مسببات امراض النبات .

للفطر *Trichoderma* spp. القابلية على انتاج مركبات كيمياوية في الايض الثانوي الى المحيط الخارجي تؤثر بشكل سلبي في المسببات المرضية ، اذ تمكن Weindling وEmerson عام 1936 ولاول مرة من عزل مادة سامة من راشح مزارع انواع الفطر *Trichoderma* spp. ذات تاثير سام لنمو الفطر *R.solani* اذ احتوى الراشح على مركبات الايض الثانوي من السموم الفطرية Suzukcillin , Alamethacin ، كما سجلت مادة ال Dermodin بوصفها مضاداً حيوياً ينتجه الفطر *Trichoderma* spp. لمدى واسع من البكتريا والفطريات (Axelsson ، 2006) .

اثبتت الدراسات انتاج انواع الفطر *Trichoderma* spp. لعدد اخر من مركبات الايض الثانوية التي تعمل كمضادات حياتية مثل : Alkypyrones وPeptaibols وIsomitriles وPolyketides وAcetaldehyde وDiketopiperazines وsesquiterpenes steroids وTrichorzianinse وPyrone(6-p-p) – alpha -6-pentyl وAlamethacin و Trichodermin و Gliotoxin التي تعمل على تثبيط نمو وكبح الكثير من المسببات المرضية من الفطريات والبكتريا مثل *R.solani* و*F.oxysporum* و *Sclerotium rolfsii* و *Macrophomina phaseolina* (Scharf واخرون ، 2016 وSulaiman و Youns ، 2019) .

7-2: السم الفطري Gliotoxin المنتج من قبل الفطر *Trichoderma* spp. .

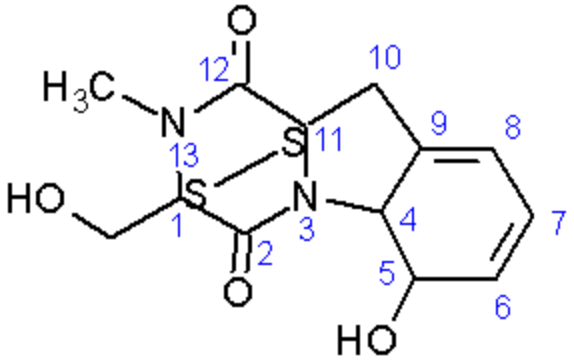
على مدى العقود الأخيرة ، أنتجت التجارب المختبرية والميدانية قدرًا كبيرًا من البيانات المتعلقة بالاستخدام الواعد للكائنات الحية الدقيقة المفيدة للسيطرة على أمراض النبات، وهنالك اهتمام خاص للفطريات المنتجة للسموم الفطرية والتي تؤثر في نمو وتواجد المسببات المرضية ،اذ توسع العمل بهذا الجانب لتقييد استخدام مبيدات الآفات الكيميائية التجارية الحالية (Silva، 2019) فقد اشار

Chohan وآخرون (2019) بأن العديد من انواع الفطر *Trichoderma* spp. لها القابلية على انتاج السموم الفطرية التي لها القابلية على تثبيط المسببات المرضية . والتي من أهمها *T. harzianum* و *T. viridae* يمكن أنْ تستعمر في منطقة الرايزوسفيرا وإنتاج السموم الفطرية (المضادات الحيوية) مثل Viridin و Gliotoxin وإنزيمات تحلل جدار الخلية .

ينتمي السم الفطري Gliotoxin (GT) الى فئة المستقلبات الثانوية التي تظهر مجموعة متنوعة من الأنشطة البايلوجية بما في ذلك الخصائص المضادة للفايروسات والفطريات والبكتريا كما تظهر نشاطاً قوياً في تحسين المناعة في الجسم الحي وفي المختبر وادت خصائصها الى عدد من الدراسات المبكرة لاستغلال قيمتها العلاجية الكيميائية المحتملة وفي الآونة الأخيرة أدت خصائصها الانتقائية المثبطة للمناعة الى إمكانية العلاج خارج الجسم الحي للانسجة لإزالة الخلايا المناعية المسوؤلة عن رفض الانسجة بشكل انتقائي ويبدو أنَّ طريقة عمل السم تكون عن طريق التفاعل التساهمي مع البروتينات وقد ثبت أنَّ Gliotoxin يثبط عدد من الانزيمات . (Waring و Beaver ، 1996)

يعد سم Gliotoxin مركباً نشطاً للغاية بواسطة التحليل الطيفي وهو أهم سم فطري من نوع Epithiodioxopiperazine(ETP)، تم عزل GT في الأصل من أنواع *Trichoderma* spp. كمضاد حيوي تشارك في المكافحة الاحيائية للفطريات المسببة للأمراض النباتية ، يُعرف GT منذ فترة طويلة بأنه عامل مثبط للمناعة ويقال أيضًا أن له خصائص مضادة للورم ومع ذلك ، تشير المنشورات الحديثة إلى أن Gliotoxin هو محدد ضراوة لمسببات امراض الانسان مثل *Aspergillus fumigatus* وبالتالي فإن هذا المركب مهم من عدة جوانب حيث له خصائص طبية ومحدِّد إمراضية وعلامة تشخيصية محتملة ومهم في حماية المحاصيل البيولوجية. (Tomah واخرون ، 2020) (Sulaiman و Youns ، 2019) .

ويكون التركيب الكيميائي له



يصف مركبات السم Gliotoxin والتي تم تحديدها على أنها ذات نشاط قوي مضاد للفيروسات يثبط فيروس الأنفلونزا A مما يشير إلى نشاط غير محدد واسع الطيف لهذا المركب، وقد تم استخدام هذه المركبات سابقًا في جوانب مختلفة من العلاج المضاد للبكتيريا والفطريات وتشير النتائج الحالية إلى أنه على الرغم من أنها غير مناسبة للإدارة الداخلية ، إلا أنها قد تكون قابلةً للتطبيقات الموضعية المضادة للفيروسات ، أو كمطهرات وتوفر عناصر تحكم إيجابية ممتازة للدراسات المستقبلية . (Aljofan و اخرون ، 2009)

تم اكتشاف السم Gliotoxin لأول مرة كمركب ينتجه *Trichodermin* spp.، في الوقت الحاضر من المعروف أن Gliotoxin ينتج عن عدة أنواع من الفطريات مثل *T. virens* و *T.lignorum* و *T. viride* و *Gliocadium fimbriatum* و *Eurotium chevalieri* و *Neosartorya pseudofischeri* وبعض أنواع *Penicillium* spp. وبعض *Acremonium* spp. ووجد بعض الباحثين أن الخميرة *Candida* spp. تنتج السم Gliotoxin (Scharf واخرون ، 2016 و Silva، 2019) .

يمتلك Gliotoxin مجموعة من الأنشطة البيولوجية وقد جذب الانتباه في وقت مبكر بسبب خصائصه المضادة للميكروبات (المضادة للبكتيريا والفطريات والفيروسات) عن طريق منع تكاثر بعض البكتيريا والفطريات والفيروسات اهتمام متجدد بالنشاط البيولوجي للسم Gliotoxin متبوعًا بملاحظة أن السم أظهر نشاطًا مثبطًا للمناعة ، في كل من المختبر وفي الجسم الحي من خلال تحريضه لموت الخلايا المبرمج وتثبيط التنشيط وانتشار الخلايا التائية والخلايا البائية نظرًا للخصائص المضادة للميكروبات والمناعة . (Axelsson، 2006)

8-2: دور الفطر *Trichoderma* spp. في استحثاث المقاومة الجهازية للنباتات ضد المسببات المرضية .

تتمتع النباتات بآليات مقاومة طبيعية للدفاع عن نفسها ضد الكائنات المسببة للأمراض والتي تتميز بقدرة النبات على المقاومة لتقليل أو تجنب مهاجمة مجموعات معينة من مسببات الأمراض النباتية (Oliveira واخرون ، 2016) . وأدى البحث والدراسات الحديثة الى فهم المسارات والإشارات الطبيعية بالنبات إلى اكتشاف مركبات طبيعية وصناعية تسمى محرضات المقاومة التي تحفز الاستجابات الدفاعية في النباتات المشابهة لتلك التي تسببها العدوى المسببة للأمراض (Gomez Vasquez واخرون ، 2004) .

استخدمت طريقة استحثاث المقاومة الموضعية (Induced local resistance) في النبات في بداية القرن العشرين في تجارب البطاطا ضد مرض اللفحة المتأخرة *Phytophthora infestans* عند استخدامه لفطريات ممرضة واخرى غير ممرضة ، وتم الايضاح في دراسات لاحقة مفهوم الدفاع الفعال للنبات والذي سمي بالمقاومة النباتية وكشف أساس استجابة النبات بعد الاصابة لمركبات كيميائية سميت بالفايتواليكسينات ، واشارت دراسات الى استحثاث المقاومة في عدد من النباتات وبدأت دراسات تسعى الى تعزيز المقاومة الجهازية في النبات وخصوصا ضد مسببات الامراض النباتية ، تم استخدام الفطر *T.harzianum* لتحريض النباتات ضد الاصابة الفايروسية والفطرية ، كما ان الفطر *T.virnes* استخدم في تحفيز المقاومة الجهازية لانه ينتج مواداً تربينية (Terpenoids) تزيد من فعالية انزيم Peroxidase في جذور النبات ضد المسببات المرضية (Howell واخرون ، 2000) .

اذ يعد فهم تحريض دفاعات النبات ضد المسببات المرضية باستخدام عوامل المكافحة الاحيائية أمرًا ضروريًا لتطوير استراتيجيات جديدة ضد هذه العوامل الممرضة ، نظرًا لعدم فعالية العلاجات الكيميائية ، وتوسعت الدراسات باستخدام هذه العوامل ضد الاصابات الفطرية والبكتيرية ، فأدى استخدام الفطر *T. harzianum* إلى تعزيز نمو النبات بالاضافة الى ظهور مقاومة جهازية من خلال مسارات تأشير حمض الجاسمونيك / الإيثيلين وحمض الساليسيليك. (Vitti واخرون 2016).

وفي دراسات اخرى ولأهمية بعض المحاصيل الحقلية مثل الحنطة والخسائر التي يتعرض لها بسبب امراض تعفن الجذور المتسببة عن الفطر *R. solani* فقد أجريت دراسة لتقيم كفاءة استحثاث العامل الاحيائي *T.harzianum* والعامل الكيميائي حامض السالسلسك في مقاومة هذا المرض باستخدام اليات استحثاث المقاومة الجهازية وتقيم كفاءة الاستحثاث في مؤشرات النمو الخضرية والإنتاجية لعدد من أصناف الحنطة العراقية .(حسن والقيسي ،2019)

وكان للفطر *T.harizanum* تأثيراً إيجابياً في تقليل التأثير الضار لفطر *Rh.solani* في جميع متغيرات النمو على شدة المرض على نبات البامية بالاضافة الى تحريض المقاومة الجهازية ضد المسبب المرضي (Matrood و Al-taie ، 2017) . بينما استعمل فطر *T. harizanum* لمعرفة مدى فعاليته كسماد حيوي بدلاً من الأسمدة الكيميائية اذ تمت اضافته الى تربة مزروعة ببذور الطماطة ، اظهرت النتائج وجود زيادة معنوية لجميع الصفات المدروسة على أنَّ الفطر له دور إيجابي في دعم وتغذية النبات واستحثاث مقاومتها ضد امراض الذبول.(السرحاني واخرون ،2017) في حين درس كل من عبيد والجنابي 2013 إمكانية تحفيز مقاومة نباتات الخيار ضد الإصابة بفطر البياض الدقيقي بواسطة فطر المقاومة الحيوية *T. harzianum* وقد تبيّن أن سقي النباتات براشح فطر المقاومة الحيوية أدى الى خفض تجرثم الفطر *P. xanthii* على أوراق الخيار الى حوالي 53 % مقارنة مع معاملة السيطرة .

تعد أنواع *Trichoderma* spp. من بين الفطريات المفيدة الرئيسة ذات القدرة على المكافحة الحيوية وتحريض المقاومة الجهازية المستحثة (ISR) مع الأخذ في الاعتبار التطورات التقنية في علم الوراثة والتكنولوجيا الحيوية على مدى العقود الماضية ، أصبح من المجدي الآن معالجة السمات المتعلقة بالمكافحة الحيوية في الفطريات أو النباتات المضيفة ، والتي تشمل: دمج الجينات الفطرية التي تشفر المركبات المضادة للميكروبات (مثل الكيتينازات) في جينوم النبات ، أو الإفراط في التعبير أو تعطيل بعض الجينات الفطرية لتحسين كفاءة المكافحة الحيوية أو توسيع الطيف المستهدف لمسببات الأمراض ، ومنح ISR للنباتات عبر المستحثات القائمة على الفطريات. (Ghorbanpour واخرون ،2018) .

9-2 : التداخل بين أنواع أو عزلات الفطر *Trichoderma* spp.

اثبتت الكثير من الدراسات وجود حالات تضاد حيوي بين العوامل الحيوية نفسها المستخدمة في المكافحة الاحيائية ضد الممرضات النباتية فقد اثبت أن إضافة عامل المكافحة الاحيائية *T.*

harzianum لم يعطِ نتائجاً إيجابية في السيطرة على مسببات الأمراض الفطرية *F. solani* و *F. Rhizoctonia* sp. *lateritium* ، بينما تم تحسين خصائص النبات بشكل ملحوظ أثناء إضافة عامل المكافحة الاحيائية *T.viride* (Alwan و اخرون ،2012) .

و في دراسة اخرى اثبت أن استخدام اختبارات الزراعة المزدوجة بين *B. cinerea* وعزلات العوامل الحيوية *T.harzianum* و *T. viride* أظهرت أن تأثير معظم العزلات عملت على تثبيط المسبب المرضي، كما أوضحت النتائج أن المواد المتطايرة للعزلات من *T. harzianum* و *T. viride* نفسها حققت أعلى معدل تثبيط ضد B. cinerea بلغ 77٪ ، أظهر أيضًا أن عوامل المكافحة الاحيائية *T. harzianum* و *T. viride* قد حققت انخفاضًا في معدل الإصابة وشدة الإصابة بالفطريات الممرضة الاخرى (Al-Esawee و AL-Taae ، 2016) وقد أجريت دراسة لتقييم كفاءة نوعين من *T.harzianum* و *T.viride* واثنين من عزلات فطر (*Glomus moseae*) *Mcorrhizal* (G1 و G2) ومزيجهم في تعزيز نمو شتلات الطماطة وأظهرت النتائج أن جميع معاملات العوامل الاحيائية أدت إلى انخفاض معنوي في الفترة المطلوبة لبزوغ البادرات مقارنة بمعاملة السيطرة وزيادة نسبة ظهور الشتلات لكن العزلة *T. harzianu + G1*، *T. harzianum + G2* كانت الأفضل وأظهرت النتائج أيضًا أن جميع العوامل الاحيائية وتوليفاتها أدت إلى زيادة معنوية في معظم معاملات نمو النبات .(عبد السادة واخرون ،2012)

10-2: تصنيع المبيدات الاحيائية التي يدخل في تركيبها الفطر *Trichoderma* spp.

أصبحت المكافحة الاحيائية باستخدام الكائنات الحية الدقيقة المضادة بديلاً لاستراتيجية المكافحة المتكاملة ضد الكثير من مسببات الامراض النباتية ، فمثلا تم استخدام انواع الفطر *T.viride* و *T. harzanium* و *T. asperellum* والتي أظهرت نشاطًا مضادًا ضد الفطر *Phytophthora palmivora* ،اذ تم دراسة النشاط التثبيطي لرواشح العزلات ومن ثم عزل وتشخيص المركبات الثانوية الموثرة بنمو الفطر، اذ تم تقييم التأثير المختبري لكل مركب على إنبات الكونيديا ونمو الفطريات *P. palmivora* و *P. megakaria* و *P. capsici* ، فقد اظهرت النتائج بان الفطر *T. viride* أظهر أفضل الأنشطة التضادية عن طريق انتاج مركبين نشطين هما viridin و gliovirin ضد المسبب المرضي ، إلى جانب كونهما نشطين بشكل منفصل فإن هذين المركبين لهما تأثير تآزري في تثبيط نمو الفطريات وإنبات الكونيديا ،على

الرغم من استخدام جنس *Trichoderma* spp. على نطاق واسع لعقود من الزمن كعنصر تحكم بيولوجي مهم في الزراعة ، إلا أنه لم يدخل في سوق المبيدات الحيوية الا مؤخرًا ، وذلك بفضل تعدد استخداماته في السيطرة على الأمراض النباتية والعمل كمحسّن لنمو النبات، اذ تحتوي معظم منتجات *Trichoderma* spp. التجارية على الكونيديا الهوائية كمكون نشط (الجزء الحيوي) ، ولكن تشير الدراسات الحديثة إلى امكانية إنتاج تراكيب تكاثرية أخرى ،أكثر قوة ومقاومة للظروف البيئية غير الملائمة وهي الاجسام الحجرية الدقيقة Microsclerotia (MS) (Pakoraواخرون 2018) .

تعد العوامل الميكروبية الحيوية المرتبطة بالنبات بدائلاً صالحة لمبيدات الآفات الكيميائية ، ففي دراسة لتقييم اختبار الفطريات المفيدة التي تنتمي إلى جنس *Trichoderma* spp. ، من أجل تطوير بديل مبتكر واقتصادي ومناسب للمبيدات والأسمدة الكيميائية،تم اختبار التأثيرات المضادة لعزلات *Trichoderma* spp. ضد ثلاثة أنواع من الفطريات الممرضة *Sclerotinia* spp. و *F.oxysporum* و *F.solani* فقد أظهرت النتائج المقدمة في هذه الدراسة تعزز مفهوم المكافحة البيولوجية وتعزيز نمو النبات بواسطة *Trichoderma* spp. كاستراتيجية بديلة لاستحثاث المقاومة ومكافحة المرض (Paudel واخرون ، 2017) .

2-11: التشخيص الجزيئي للفطر *Trichoderma* spp. وسمومه الفطرية

خلال العقد الماضي تضاعفت أنواع الفطر *Trichoderma* spp. الى عدة مرات ووصلت الى حوالي 100 نوعٍ واصبح تحديد الأنواع صعب نظراً الى الأنواع المتشابهة مظهرياً فقد شخصت هذه الأنواع بالاعتماد على تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) (Kubicek و Harman ، 1998) وهي واحدة من التقانات الجزيئية المستخدمة في تشخيص الكائنات الحية و منها الفطريات التي تعتمد على إنتخاب و تضخيم منطقة محددة من جينوم الفطر و الكشف عن التغايرات أو التشابه في تسلسلات نواتج الحامض النووي (PCR-amplified products) لتلك المناطق الجينية المضاعفة من تلك الإنواع الفطرية والتي ستؤكد التشخيص المظهري للفطريات المدروسة (Nayaka واخرون ، 2008 و Al-Sanae واخرون ، 2016) تم استخدام المناطق الوراثية المستندة إلى ITS1 و ITS4 لتحديد التتابع النيوكلوتيدي وكشفت العلاقة التطورية بين الانواع (AL-Abedy و اخرون ، 2020) .

تم وضع استراتيجية تفاعل البوليمير المتسلسل المتعدد (PCR) من أجل التشخيص السريع للفطريات وخاصة المنتجة للسموم الفطرية ، وتم تطوير طريقة تحليلية محسّنة لتحديد السموم الفطرية المتعددة في وقت واحد في الكثير من الحاصلات الزراعية وخاصة حبوب الحنطة عن طريق HPLC – او قياس الطيف الكتلي الترادفي (LC / MS / MS) بدون الحاجة إلى أي تنظيف، بينما تعد طريقة تفاعل البوليمير المتسلسل المتعدد المحسَّنة شديدة التحديد في الكشف عن الأنواع الفطرية التي تحتوي على جينات المسار الأيضي الخاصة بالسموم الفطرية من اهم طرق الكشف عن السموم الفطرية ، فقد أظهرت النتائج وجود علاقة قوية بين وجود جينات التخليق الحيوي للسموم الفطرية كما تم تحليلها بواسطة PCR واكتشاف السموم الفطرية بواسطة LC / MS / MS تشير النتائج الحالية إلى أن نهجًا مشتركًا قد يوفر اكتشافًا سريعًا ودقيقًا وحساسًا لأنواع السموم الفطرية في الحاصلات (Sadhasivam واخرون ، 2017) .

2-12: طرق الكشف عن السموم الفطرية

هنالك العديد من الطرق المستخدمة في كشف وتقدير السموم الفطرية منها الطريقة البايلوجية التي تعتمد على التغيرات الفسيولوجية التي تحدث في انسجة الكائنات المختبرية بعد تجريعها بالسم والطرق الكيميائية التي تعتمد على التحليل الكيميائي باستخدام الأجهزة مثل High performance liquid chromatography (HPLC) و Thin-layer Chromatography (TLC) وغيرها ، والطرق المناعية التي تعتمد على التفاعل الحاصل بين الاضداد والاجسام المضادة مثل تقنية الاليزا Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) (Majdinasab و اخرون ،2021) .

2-12-1: كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء High performance liquid chromatography (HPLC)

هذه التقنية استخدمت لتحديد وفصل السموم الفطرية بسبب حساسيتها ودقتها المحسنة وكذلك امكانية تطبيقها على اكثر من سم واحد، لأنَّها يمكن أنْ تطبق على عدد من السموم الفطرية متضمنة الافلاتوكسينات B1,B2,G1,G2 (Li واخرون ،2019) .بينما الفوائد الرئيسية من استخدام HPLC أكثر من TLC كونها آلية سريعة وذات دقة محسنة ويمكن إعادة تدوير المرحلة المتحركة ، بينما عيوب هذه التقنية هي ان الخلايا تكون غير ثابتة ، والخلايا تكون في كثير من الأحيان محتاجة لإعادة تعبئة واشارة الكاشف تضعف بمرور الوقت (Bokhari, 2002) .

3: المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1: الأجهزة والادوات والمواد المستخدمة في أجراء التجارب .

جدول 1: الأجهزة والادوات المستخدمة في أجراء التجارب الواردة في البحث .

ت	الجهاز	الشركة المصنعة	المنشا
1	الحاضنة (Incubator)	Memmert	Germany
2	المؤصدة (Autoclave)	LabTech	South Korea
3	ثلاجة (Refrigerator)	L.G	Korea
4	مجهر ضوئي مركب (Compound light Microscope)	Olympus	Japan
5	ميزان حساس (balance Analytical)	Sartorius	U.K.
6	انابيب اختبار (Test tubes)	Sigma	England
7	اطباق بتري (Petri-Dishes)	-	Chine
8	دوارق زجاجية مختلفة الاحجام (Flasks)	Unisonic LTD	England
9	اوراق ترشيح (Filter Papers)	Whatman	England
10	شرائح زجاجية (Slides and cover (slide	Whatman 4	England
11	محقنة طبية (Medical Syringe)		England
12	Hood	LabTech	South Korea
13	جهاز تقطير(Distillation)	GFL Gesellschaft fur Laborttechnik	Germany
14	جهاز هزاز (Vortex)	Heidolph	Germany
15	أوراق سليفون	Zhangjiagang	China
16	اصص بلاستيكية(Anvil)	---	China
17	القطن (Cotton)	BDH	England
18	milepor	Sartorius Stedim	Germany
20	جهارUv	---	Japan
21	جهار HPLC	---	Japan
23	جهاز EC	---	Germany
24	مناخل (Sieves)	Ogawa seikico	Japan
25	سحاحة	---	China

China	Mammanlex	مطحنة كهربائية	26
France	---	جهاز المطياف الضوئي (spectrophotometry)	27
Japan	Ogawa seikico	جهاز قياس درجة الاس الهيدروجيني (pH-meter)	28
---	---	Loop	29
Germany	---	ثاقب فليني (Cork Borer)	30
Germany	HettichEBA.20	جهاز الطرد المركزي Centrifuge Cooling	31
China	---	Ultrasonic bath	32

جدول 2: المواد الكيميائية المستعملة في إجراء التجارب الواردة في هذه الدراسة .

ت	المواد الكيميائية	الشركة المصنعة	المنشا
1	اكار(Agar)	Himedia	India
2	ماء مقطر (Distilled water)	---	---
3	كحول اثيلي (Ethanol)	الجود	Iraq
4	مضاد حيوي Amoxicillin	Samara	Iraq
5	مضاد حيوي Chloramphinicol	Samara	Iraq
6	كلوروفورمchloroform	HIMEDIA	INDIA
7	ميثانولmethanol	HIMEDIA	INDIA
8	خلات الاثيلethyl acetate	HIMEDIA	INDIA
9	دايكرومات البوتاسيوم potassium dichromate	HIMEDIA	INDIA
10	حامض الكبريتيك المركز Concentrated sulfuric acid	BDH	England
11	سلفات الفضةsilver sulfate	BDH	England
12	حامض الفسفورphosphorous acid	BDH	England
13	داي فينل امينDivinyl Amin	HIMEDIA	INDIA
14	سلفات الحديد iron sulfate	HIMEDIA	INDIA
15	stander	Biobiopha	China
16	فورمالين Formalin	Fluka	Switzerland
17	Sodium Phosphate Buffer	HIMEDIA	INDIA
18	الكاتيكـــول Catechol	HIMEDIA	INDIA
19	Pyrogallol	BDH	England

20	H2O2	BDH	England
21	كاشف فولن Folin – Ciocalteau	BDH	England
22	كاربونـــات الصوديوم	HIMEDIA	INDIA
23	حامضGallic Acid	BDH	England

جدول 3: الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة .

ت	الوسط الزرعي	الشركة المصنعة	الغرض من استخدامه
1	وسط البطاطا دكستروز آكار Potato Dextrose Agar (P.D.A.)	India-Himedia	لعزل وتنمية وتشخيص الفطريات
2	وسط الآكار المائي Water Agar (W.A.)	حضر مختبريا	لمعرفة أمراضية الفطريات
3	وسط البطاطا سكروز السائل Potato Sucrose Broth (P.S.B.)	حضر مختبريا	للحصول على العالق الفطري
4	وسط البطاطا سكروز الصلب Potato Sucrose Agar (P.S.A.)	حضر مختبريا	للحصول على العالق الفطري
5	وسط الرز	حضر مختبريا	لتنمية الفطر
6	وسط الدخن	حضر مختبريا	لتنمية الممرضات
7	وسط جريش الذرة الصفراء	حضر مختبريا	لتنمية الفطر

جدول 4: جميع الفطريات المستخدمة بالدراسة .

ت	الفطريات	مكان العزل او مكان الحصول عليه
1	*Trichoderma* spp.	53 عزلة تم عزلها من تربة محاطة بجذور نباتات سليمة مختلفة
2	*Rhizoctonia* sp.	جذور نباتات خيار مصابة
3	*Pythium* sp.	جذور نباتات خيار مصابة
4	*Sclerotinia sclerotiorum*	مختبر الدراسات العليا كلية الزراعة جامعة كربلاء (د.رجاء غازي)
5	*Fusarium* sp.	جذور نباتات خيار مصابة

3-2: تحضيرالأوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص وتنمية الفطريات .

استخدمت في هذه الدراسة أوساطاً زرعية مختلفة لعزل الفطريات وتنميتها وتشخيصها وكذلك لغرض أجراء التجارب الخاصة بها وكما يأتي :

3-2-1: وسط البطاطا سكروز اجار Potato Sucrose Agar (P.S.A) .

حضر الوسط بأخذ 200 غم من درنات البطاطا المقشرة والمقطعة الى قطع صغيرة وغليها بالماء المقطر بحجم 500 مل لمدة 20 -30 دقيقة في دورق زجاجي وبعد إنتهاء مدّة الغليان رشح المخلوط في دورق زجاجي بقطعة من القماش الشاش للحصول على الراشح ، اذيب 10 غم من سكر السكروز و17 غم من الاكار في 500 مل اخرى ثم اضيف إليها راشح البطاطا واكمل الحجم الى واحد لتر، اضيف اليها 250 ملغم / 1لتر من المضاد الحيوي Chloramphinicol، وزع الوسط في دوارق زجاجية بحسب الحاجة واغلقت فوهاتها بسدادات من القطن وعقمت بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدّة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 مْ وقبل التصلب ثم صب الوسط في الأطباق البترية حسب التجربة المطلوبة او حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

3-2-2:وسط البطاطا دكستروز آكار الجاهز Potato Dextrose Agar P.D.A.

حضر بإذابة 39 غم في واحد لتر من الماء المقطر حسب تعليمات الشركة المصنعة ثم اضيف إليه المضاد الحيوي Chloramphinicol ثم عقم بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدّة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 مْ وقبل التصلب ، ثم صب الوسط في الأطباق البترية حسب التجربة المطلوبة أو حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

3-2-3: وسط الاكار المائي (W.A) Water Agar .

حضر باذابة 17 غم من الاكارفي واحد لتر من الماء المقطر وتوزيعه في دوارق زجاجية حسب الحاجه، وتعقيمه بواسطة جهاز الموصدة عند درجة حرارة 121 م ه وضغط 15 باوند /انج2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 مْ وقبل التصلب ثم اضيف إليه المضاد الحيوي Chloramphinicol ثم حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال .

4-2-3: وسط البطاطا سكروز السائل (Potato Sucrose Broth (P.S.B. .

حضر هذا الوسط بغلي 200 غم بطاطا لكل لتر ماء لمدة 30 دقيقة ثم اخذ الراشح و اضفنا 10 غم سكر سكروز وخلط جيدا وغلق باحكام وعقم بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدّة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 م° وقبل التصلب ثم اضيف إليه المضاد الحيوي Chloramphinicol ثم صب الوسط في انابيب اختبار خاصة حسب التجربة المطلوبة و حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال (Colleeو اخرون، 1996)

5-2-3: وسط الرز .

حضر الوسط باستعمال الرز (Oryza sativa) ، وذلك بعد غسلها جيدا للتخلص من الاتربة والشوائب وتنقيعها لمدة ساعة واحدة بالماء، بعد التخلص من الماء الزائد منها بوضعها على قطعة من الشاش، وزعت باوزان متساوية في اكياس بلاستك حرارية ، وأغلقت بإحكام بعدها عقمت جميعها بواسطة المؤصدة في درجة حرارة 121 °م و ضغط 15 باوند/ انج^2 و لمدة 20 دقيقة ، وبعد انتهاء مدة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 م° وقبل التصلب ثم اضيف إليه المضاد الحيوي Chloramphinicol (Richard وDeBey ، 1995) .

6-2-3: وسط الدخن .

استعملت بذور الدخن المحلي (*Panicum miliacem*) وذلك بعد غسلها جيدا للتخلص من الاتربة و الشوائب و تنقيعها لست ساعات بالماء بعد التخلص من الماء الزائد منها بوضعها على قطعة من الشاش، وزعت باوزان متساوية في دوارق زجاجية حجم كل منها 250 مل و أغلقت بإحكام بعدها عقمت جميع الدوراق بواسطة المؤصدة في درجة حرارة 121 °م و ضغط 15 باوند/ انج^2 و لمدة 20 دقيقة ، وبعد انتهاء مدة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 م° وقبل التصلب ثم اضيف إليه المضاد الحيوي Chloramphinicol وحفظت لحين الاستعمال (Dewan، 1989).

7-2-3: وسط جريش الذرة الصفراء .

حضر الوسط بعد الحصول على جريش الذرة عن طريق سحق بذور الذرة الصفراء بواسطة طاحونة ومن ثم تم ترطيب الجريش لمدة 3 ساعات ثم وضعت في أكياس حرارية وعقمت بواسطة المؤصدة في درجة حرارة 121 °م و ضغط 15 باوند/ انج^2 و لمدة 20 دقيقة ،

وبعد انتهاء مدة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 مْ وقبل التصلب ثم اضيف إليه المضاد الحيوي Chloramphinicol وحفظت لحين الاستعمال .

3-3: جمع العينات .

تم جمع عينات التربة المطلوبة لعزل انواع الفطر *Trichoderma* spp. بينما تم جمع عينات نباتات الخيار المصابة لعزل مجموعة الفطريات الممرضة المختلفة المستخدمة في الدراسة .

3-3-1: جمع عينات التربة .

جمعت عينات التربة من عدد من محافظات العراق (كربلاء ، بغداد ، النجف ، ديوانية ،بابل , الناصرية ، كركوك ، الموصل ، ديالى ، الكوت) من منطقة الرايزوسفير لمجموعة من النباتات السليمة ظاهريا ووضعت في أكياس نايلون ونقلت الى المختبر لأجراء الدراسة عليها بعد تثبيت كل البيانات من تاريخ الجمع واسم النبات والمنطقة وغيرها (جدول 5) ، وجمعت العينات ابتداء من تاريخ 2020/8/28 الى 2021 /1/5 .

3-3-2: جمع عينات نباتات الخيار المصابة .

تم القيام بالعديد من الزيارات الحقلية إلى المشاتل والحقول المزروعة بمحصول الخيار في محافظة كربلاء ، شملت حقول كلية الزراعة – جامعة كربلاء وحقول ومزارع قضاء الحسينة ، ومناطق مختلفة من المزارع الصحراوية جمعت نماذج من شتلات ونباتات الخيار التي تظهر عليها أعراض الإصابة بالأمراض ووضعت في أكياس بلاستيكية ونقلت إلى المختبر ثم حفضت في الثلاجة لحين إجراء عملية العزل .

جدول5 : رموز العينات ومكان جمعها ونوع النباتات التي جمعت بالقرب من جذورها .

ت	المحافظة										
	البيانات	كربلاء	بابل	ديوانية	نجف	بغداد	ناصرية	كركوك	موصل	ديالى	كوت
1	رمز العينة	K1	H1	D1	N1	B1	S1	R1	M1	E1	T1
	مكان الجمع	المركز	حي الشهداء	غماس	حي الأمير	شارع فلسطين	الهنية	القلعة	برطلة	ناحية مندي	قضاء الاحرار
	اسم النبات	حمضيات	حمضيات	نخيل	السدر	ياس	شعير	نارنج	كالبتوز	كالبتوز	بصل
2	رمز العينة	K2	H2	D2	N2	B2	S2	R2	M2	E2	T2
	مكان الجمع	طويريج	الطهمازية	مركز	العسكري	شارع فلسطين	ستة كيلو	الصالحي	الشورة	كنعان	قضاء الاحرار
	اسم النبات	حمضيات	خضر	اكاسيا	السدر	ختمة	شعير	حمضيات	نبات زينة	كالبتوز	حنطة
3	رمز العينة	K3	H3	D3	N3	B3	S3	R3	M3	E3	T3
	مكان الجمع	مزرعة فدك	أبو غرق	سيد طالب	الحيدرية	محمودية	المسافر	الدبس	حمام العليل	امام منصور	ناحية المالح
	اسم النبات	رمان	خضر	ذرة بيضاء	اكاسيا	باذنجان	ماش	برتقال	صنوبر	حنطة	فاكهة
4	رمز العينة	K4	H4	D4	N4	B4	S4	R4	M4	E4	T4
	مكان الجمع	عين التمر	لهناوية	جامعة القادسية	عباسية	بياع	المهنة	بشير	بيجي	الدهلكية	سيد مالك
	اسم النبات	باذنجان	ذرة بيضاء	زينة	ذرة بيضاء	أشجار زينة	جت	تين	نبات زينة	صبار	ثيل
5	رمز العينة	K5	H5	D5	N5	B5	S5	R5	M5	E5	T5
	مكان الجمع	حي العباس	المعمرة	الحفار	نفاخ	كرادة	ال أبو علي	شوان	القحطانية	بلدروز	المركز
	اسم النبات	رمان	خضر	جت	باميا	جوري	خس	تكي	حنطة	حنطة	حنطة
6	رمز العينة	K6	H6	D6	N6	B6	S6	R6	M6	E6	T6
	مكان الجمع	جمالية	القاسم	شافعية	الحيرة	منصور	قطاع 26	امام قاسم	قضاء كلك	كنعان	الموفقية
	اسم النبات	خضر	خضر	باميا	باميا	شوكة عيسى	زينة	زيتون	مطاط	نخيل	حنطة
7	رمز العينة	K7	H7	D7	N7	B7	S7	R7	M7	E7	T7
	مكان الجمع	وند	السدة	شامية	مشخاب	كاظمية	نهر الحسينية	قشلة	تلعفر	امام عسكر	بدرة
	اسم النبات	رمان	مشمش	سدر	ذرة بيضاء	نارنج	خضر	نبك	شماسة	عنب	حنطة
8	رمز العينة	K8	H8	D8	N8	B8	S8	R8	M8	E8	T8
	مكان الجمع	الحر	الكفل	سنية	مناذرة	بياع	الغوالب	بازادي	بعشيقة	بلدروز	شيخ سعد
	اسم النبات	خضر	خضر	باميا	زينة	نبات زينة	اوليفيرا	تين	شجر معمر	نخيل	حنطة
9	رمز العينة	K9	H9	D9	N9	B9	S9	R9	M9	E9	T9
	مكان الجمع	الحسينية	زيد بن علي	اطراف	مفرك الكفل	بسماية	الازايج	المصلى	برطلة	قرية الدابنة	الشطرة
	اسم النبات	ورد	باميا	اشجار زينة	خضر	نبات زينة	حنطة	عرموط	خوخ	تكي	حنطة
10	رمز العينة	K10	H10	D10	N10	B10	S10	R10	M10	E10	T10
	مكان الجمع	سياحي	المسيب	سدير	سهلة	مستنصرية	الهورة	تازة خورماتو	بعشيقة	مندلي	بدرة
	اسم النبات	ياس	نارنج	اكاسيا	نبات زينة	نخيل	دنان	مشمش	توت	ياس	نبات زينة

3-4: العزل والتشخيص

3-4-1: عزل وتشخيص فطريات *Trichoderma* spp. من عينات التربة .

عزلت الفطريات المرافقة لعينات التربة ومنها الفطر *Trichoderma* spp. عن طريق تحضير سلسلة من التخافيف لكل عينات التربة ، بأخذ 1 غم من التربة بعد خلطها جيدا واضافته إلى 9 مل من الماء المقطر المعقم بانابيب اختبار متسلسة ، وتم رج المعلق لمدة 30 ثانية ثم إجراء سلسلة من التخفيفات .

واخذ 1 مل من التخفيف الرابع والخامس من كل عينة ، واضيف الى اطباق بتري تحوي على الوسط PDA وتم تحريكها بحركة رحوية لضمان توزيعها بشكل متساوي على سطح الوسط ثم تم تحضين الأطباق عند 25±2 م ° لمدة 2-3 ايام ومتابعتها باستمرار لتنقيتها وتشخيصها لاحقا (Schaad واخرون ، 2001)

3-4-2: عزل الفطريات الممرضة المرافقة لنباتات الخيار المصابة .

تم عزل الفطريات المرافقة لنباتات الخيار المصابة ، باخذ عينات عشوائية من النباتات التي تظهر عليها اعراض اصابة فطرية متمثلة بالاصفرار او الذبول او موت البادرات وغيرها ،تم اخذ الجذور وقواعد السيقان ، وتقطيعها بحجم 0.5 سم بعد غسلها جيدا، تم تعقيمها سطحيا بواسطة هايبوكلورات الصوديوم الذي تركيزه 2% لمدة دقيقتين ، بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لازالة بقايا المحلول المعقم ثم ازيل الماء الزائد منها باستعمال ورق ترشيح ، بعدها نقلت الاجزاء المعقمة بواسطة ملقط معقم الى اطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي P.D.A وبواقع خمسة اجزاء لكل طبق وبواقع اربعة مكررات ، حضنت الاطباق في درجة حرارة 25±2 م ° وبعد اربعة ايام تم فحص المستعمرات الفطرية النامية وفحصت تحت المجهر لغرض تشخيصها وحفظها (Lacey واخرون.1999).

3-5: تنقية وتشخيص الفطريات المعزولة .

بعد عزل الفطريات من عينات التربة و جذور نباتات الخيار وبادراتها ، تم تنقيتها بطريقة البوغ المنفرد باستخدام طريقة التخطيط على عدد من الاطباق (Streak-plate method) بواسطة أبره ذات حلقة دائرية (Loop) معقمة في أطباق بتري حاوية على الوسط الزرعي PDA المعقم ثم حضنت الاطباق في الحاضنة على درجة حرارة 25±2°م لمدة يومين بعدها تم اخذ المستعمرة النابتة من البوغ المنفرد ونقلت الى اطباق جديدة حاوية على الوسط نفسه وحضنت

لمدة خمسة أيام (Samson واخرون، 2004) ، فحصت المستعمرات الفطرية التي ظهرت باستخدام المجهر الضوئي المركب ثم شخصت مظهرياً اعتمادا على الصفات المظهرية والمجهرية وبأتباع المفاتيح التصنيفية التي ذكرها كل من Leslie و Summerell (2006) و Pandianوآخرون (2016) و Dıaz-Najerag وآخرون، (2021) وبمساعدة (أ.م. د. ياسر ناصر حسين الحميري) وبعدها تم حساب النسب المئوية للظهور (Occurence) للعزلات الفطرية و كذلك تم حساب النسبة المئوية لتردد عزلات الفطر الواحد بالعينات (Frequency) . وفقا للمعادلات التالية :

$$\text{النسبة المئوية لظهور العزلات الفطرية} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها الفطر}}{\text{العدد الكلي للعينات}} \times 100$$

$$\text{النسبة المئوية لتردد عزلات الفطر} = \frac{\text{عدد عزلات الفطر الواحد (النوع او الجنس)}}{\text{عدد العزلات الكلية في العينات}} \times 100$$

3-6: حفظ العزلات الفطرية المعزولة .

حفظت عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المعزولة من التربة والفطريات الممرضة *Fusarium* sp. و *Rhizoctonia* sp. و *Pythium* sp. على وسط البطاطا P.D.A. المصبوب في انابيب أختبار زجاجية حجم 50 مل بوضع 20 مل من الوسط في كل أنبوبة وتم تعقيمها في جهاز التعقيم البخاري بدرجة حرارة 121°م وضغط 15 باوند/إنج^2 لمدة 20 دقيقة، بعد انتهاء التعقيم تركت الانابيب لحين وصول درجة الحرارة 45 م° وقبل التصلب ثم اضيف إليه المضاد الحيوي Chloramphinicol وضعت الانابيب بشكل مائل حتى التصلب لقحت الانابيب بقرص قطر 0.5 سم مأخوذ من العزلات الفطرية النقية النامية على وسط P.D.A. وبعمرسبعة أيام بواقع اربعة مكررات ، حضنت الانابيب في درجة حرارة 25°م لمدة اسبوع ثم حفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4°م لحين الاستعمال مع تجديدها كلما دعت الحاجة لذلك (Booth واخرون،1988).

واخيرا تم حفظ العزلات الفطرية الاكثر ضراوة بعد اجراء اختبارات المقدرة الامراضية تم حفظها على وسط التربة في انابيب اختبار زجاجية بعد تعقيمها لمرتين خلال 24 ساعة في جهاز

التعقيم البخاري بدرجة حرارة 121°م وضغط 15 باوند/إنج^2 لمدة 60 دقيقة ، وحفظت لحين استخدامها .

3-7:اختبارات المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *Fusarium* sp. و *Rhizoctonia* sp. و *Pythium* sp. و *Sclerotinia* sp. مختبرياً .

تم اجراء اختبار المقدرة الامراضية باستخدام بذور اللهانة على وسط الاكار والماء لـ ثماني عزلات فطرية ، أربع عزلات من الفطر *Fusarium* sp. وثلاث عزلات من الفطر *Rhizoctonia* sp. وعزلة واحدة من الفطر *Pythium* sp. المعزولة بهذه الدراسة من جذور نباتات الخيار وبادراتها وعزلة من الفطر *Sclerotinia* sp. وذلك لتقليص عددها واختيار الاكثر ضراوة منها وذلك لاستخدامها بالاختبارات والتجارب الحقلية اللاحقة .

تم تحضير أطباق حاوية على وسط الآكار المائي المعقم (بنسبة 17غم آكار لكل لتر ماء مقطر) ومن ثم تلقيحها بـعزلات الفطرية ثماني عزلة مختلفة من الفطريات بشكل منفرد وذلك من مزارع فطرية نقية بعمر سبعة أيام وبثلاثة مكررات لكل منها وبواسطة ثاقب فليني قطرة 0.5 سم يتم وضعها في وسط الطبق ثم حضنت الأطباق في درجة حرارة 25± 2°م وبعد 72 ساعة زرعت الاطباق ببذور اللهانة (صنف محلي) وتم تعقيمها بهايبوكلورات الصوديوم بتركيز (2% من المحلول التجاري الفاست) لمدة دقيقتين بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم ، وجففت بوضعها على ورقة ترشيح معقمة بعدها نقلت بواسطة ملقط معقم الى اطباق بتري وبواقع 10 بذور في كل طبق بالقرب من حافة النمو الفطري لكل من المسببات المرضية وبشكل دائري ووضعت في الحاضنة على درجة 25± 2°م ، (Christensen واخرون 1988) بعد سبعة أيام حسبت النسبة المئوية للأنبات والبذور المتعفنة والنسبة المئوية للتثبيط باستخدام المعادلات الاتية :

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

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{عدد البذور النابتة بالسيطرة} - \text{عدد البذور النابتة بالمعاملة}}{\text{عدد البذور النابتة بالمقارنة}} \times 100$$

3-8: تحضير اللقاح الفطري لكل من العزلات الفطرية المحددة .

لتهيئة وتحضير اللقاح الفطري الخاص بالعزلات الفطرية الممرضة *Fusarium* sp. و *Rhizoctonia* sp. و *Pythium* sp. و *Sclerotinia* sp. ، تم تجهيز وسط بذور الدخن *Panicum miliaceum* لتحميل لقاح العزلات الفطرية والذي تم تحضيره حسب الطريقة المذكورة في الفقرة 6_2_3 ، اذ لقحت الدوارق بالعزلات الفطرية كل على انفراد ، بواقع خمسة أقراص قطر كل منها 0.5 سم لكل دورق ، أخذت من حافة مزرعة الفطر بعمر سبعة ايام باستخدام ثاقب فليني معقم حضنت البذور المعاملة بالفطر لمدة خمسة عشر يوماً على درجة حرارة 25 ± 2 مْ اخذين بالحسبان تحريك البذور كل يومين الى ثلاثة أيام لضمان توزيع الفطر على جميع البذور الى أن أصبحت جميع البذور مغطاة بشكل كامل بنموات الفطر .

بينما تم تحضير اللقاح الفطري الخاص بعزلات الفطر الاحيائي (*Trichoderma* spp.) على وسط الرز ، والمحضر حسب الطريقة المذكورة في الفقرة 3-2-5 ، اذ تم وضع خمسة أقراص قطر كل منها 0.5 سم في كل كيس يحوي 250 غم من الوسط ، أخذت من حافة مزرعة الفطر بعمر سبعة ايام باستخدام ثاقب فليني معقم. حضن وسط الرز المعامل بالعزلات الفطرية لمدة خمسة عشر يوماً على درجة حرارة 25± 2مْ ، مع تحريك الوسط كل يومين الى ثلاث أيام لضمان توزيع الفطر على جميع اجزاء الوسط .

3-9: اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد العزلات الفطرية الممرضة .

تم اجراء عدة اختبارات لتحديد المقدرة التضادية لـ 53 عزلةً فطرية من الفطر *Trichoderma* spp. المعزولة بهذه الدراسة من عينات التربة المجموعة من اغلب محافظات العراق وذلك لتقليص عددها واختيار الاكثر مقدرة تضادية منها وذلك لاستخدامها بالاختبارات والتجارب الحقلية اللاحقة .

3-9-1: اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد العزلات الفطرية الممرضة مختبريا .

تم اختبار المقدرة التضادية لـ 53 عزلةً فطرية تابعة للفطر *Trichoderma* spp. المعزولة في هذه الدراسة ، ضد العزلات الفطرية الممرضة والمختارة سابقا (*Fusarium* sp. و *Rhizoctonia* sp. و *Sclerotinia* sp. و *Pythium* sp.) وبطريقة الزرع المزدوج

(Baker Cook،1974) اذ قسم طبق بتري قطره 9 سم حاوي على الوسط الزرعي PDA إلى قسمين متساويين، ولقح مركز القسم الأول من الطبق بلقاح الفطر الممرض حيث اخذ قرص قطره 0.5 سم من مزرعة الفطر بعمر سبعة أيام ، بينما لقح مركز القسم الأخر من الطبق بقرص قطره 0.5 سم من مزرعة الفطر *Trichoderma* spp. وبعمر سبعة أيام ، نفذت التجربة بواقع ثلاثة مكررات وضعت الأطباق في حاضنة على درجة حرارة 25± 2°م لمدة أسبوع واحد وقد تم تقدير المقدرة التضادية حسب مقياس (Bell وآخرون ، 1982) والمكون من خمس درجات :

الدرجة	المواصفات
1	فطر المكافحة الأحيائية يغطي كامل مساحة الطبق دون السماح للفطر الممرض بالنمو.
2	فطر المكافحة الأحيائية يغطي ثلثي مساحة الطبق، ويغطي الفطر الممرض الثلث الباقي من الطبق .
3	فطر المكافحة الأحيائية يغطي نصف مساحة الطبق، و الفطر الممرض تغطي النصف الأخر من الطبق .
4	فطر المكافحة الأحيائية يغطي ثلث مساحة الطبق، بينما يغطي الفطر الممرض الثلثين المتبقيين من الطبق.
5	يغطي الفطر الممرض الطبق.

ويعد العامل الإحيائي فعالاً من الناحية التضادية عند إظهار درجة تضاد تعادل 2 أو اقل مع عزلات الفطر الممرض وتم حساب النسبة المئوية للتثبيط بقياس نصف قطر مستعمرة الفطر الاحيائي باتجاه المسبب المرضي مقارنة بمعاملة السيطرة التي نمي فيها الفطر الاحيائي على مسافة 1سم عن حافة الطبق وبشكل منفرد ، وحسب معادلة Abbot التالية :

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{معدل نصف قطر المستعمرة بالسيطرة} - \text{معدل نصف قطر المستعمرة بالمعاملة}}{\text{معدل نصف قطر المستعمرة بالسيطرة}} \times 100$$

(Altindag وآخرون،2006)

2-9-3: اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد العزلات الفطرية الممرضة تحت ظروف البيت البلاستيكي .

تم اجراء هذا الاختبار على 11عزلةً فطرية من اصل 53 عزلة للفطر *Trichoderma* spp. تم انتخابها سابقا بعد اثبات قدرتها التضادية باختبار المقدرة التضادية مختبريا ضد الفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA . ولإجراء هذه التجربة تم تعقيم تربة مزيجية بواسطة جهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121°م وضغط 15 باوند/إنج^2 لمدة ساعة وليومين متتاليين والتي تم وضعها في اصص بلاستيكية صغيرة (سعة 1 كغم) وترطيبها، عوملت التربة بفطر *Trichoderma* spp. المنماة على الرز بوضع 10 غم\كغم تربة ولـثلاثة مكررات لكل عينة وتم زرع بذور الخيار المعقمة سطحيا 10 بذرة \ اصص وبعد ثلاثة أيام تم وضع الفطر الممرض 10غم\كغم لكل اصيص المنمى على وسط الدخن حسب المعاملات ادناه ولكل عزلة من عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتخبة :

1. تربة غير ملوثة للمقارنة
2. تربة ملوثة بفطر *Trichoderma* sp. فقط
3. تربة ملوثة بفطر *Fusarium* sp. + *Trichoderma* sp.
4. تربة ملوثة بفطر *Rhizoctonia* sp. + *Trichoderma* sp.
5. تربة ملوثة بفطر *pythium* sp. +*Trichoderma* sp.
6. تربة ملوثة بفطر *Fusarium* sp. فقط
7. تربة ملوثة بفطر *Rhizoctonia* sp. *فقط*
8. تربة ملوثة بفطر *pythium* sp. *فقط*

حسبت النسبة المئوية لانبات البذور بعد مرور أسبوعين من الزراعة حسب المعادلة الاتية:

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

كذلك حسبت النسبة المئوية لموت البادرات بعد مرور ثلاث الى اربع أسابيع من الزراعة حسب المعادلة الاتية:

$$\text{النسبة المئوية لموت البادرات} = \frac{\text{عدد البادرات الميتة}}{\text{عدد البادرات الكلي}} \times 100$$

3-10: اختبار دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. في استحثاث المقاومة الجهازية في نبات الخيار ضد الفطرين الممرضين *Fusarium* sp. و *Rhizoctonia* sp.

تم اجراء هذا الاختبار على 11عزلةً فطرية من الفطر *Trichoderma* spp. التي تم اثبات قدرتها التضادية ضد الفطريات الممرضة بالاختبارات السابقة، ولإجراء هذه التجربة تم تعقيم تربة مزيجية بواسطة جهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121°م وضغط 15 باوند/إنج^2 لمدة ساعة وليومين متتاليين، وضعت بعدها في اصص بلاستيكية صغيرة (سعة 1 كغم) .عوملت التربة بعزلات فطر *Trichoderma* spp. المنماة على الرز بوضع 10 غم\كغم تربة ولثلاثة مكررات لكل عينة بعد 30 يوماً من زراعة بذور الخيار المعقمة سطحيا 10 بذور \ اصص وبعد 3 أيام تم وضع الفطر الممرض 10غم لكل اصيص المنمى على وسط الدخن حسب المعاملات المذكورة في الفقرة 3-9-2 وكم موضحة ادناه :

1. تربة غير ملوثة للمقارنة
2. تربة ملوثة بفطر *Trichoderma* sp. فقط .
3. تربة ملوثة بفطر *Fusarium* sp. + *Trichoderma* sp. .
4. تربة ملوثة بفطر *Rhizoctonia* sp. + *Trichoderma* sp. .
5. تربة ملوثة بفطر *Fusarium* sp. فقط .
6. تربة ملوثة بفطر *Rhizoctonia* sp. فقط .

لكل عزلة من العزلات المنتخبة 11 عزلة للفطر *Trichoderma* sp.

3-11: قياس بعض مؤشرات استحثاث المقاومة الجهازية النباتية بفعل عزلات الفطر *Trichoderma* spp. .

3-11-1: قياس فعالية انزيم بولي فينول اوكسيديز (PPO) Poly Phenol Oxidase .

تم قياس فعالية انزيم بولي فينول اوكسيديز (PPO) حسب طريقة Sadasivam وManickam ، 1992 و Ohja و Chatterjee ، 2012) حسب الخطوات الاتية :

1. حيث يتم خلط وسحق 1غم بشكل متجانس من أوراق نبات الخيار الفتية مع 20 مل من دارئ Sodium Phosphate Buffer بتركيز 0.1 مولاري و PH =6.5

2. وضع الخليط في جهاز الطرد المركزي المبرد بقوة 16000 دورة / دقيقة وبدرجة حرارة 4 مْ لمدة دقيقة ثم الترشيح للحصول على مستخلص الأنزيم .
3. اخذ200µL من المستخلص و اضيف إليه 1.5 مل من الدارئ الفوسفاتي Sodium Phosphate Buffer بتركيز 0.1 مولا ري و PH =7 وكذلك200µL من مادة الكاتيكول Catechol كمادة أساسية بتركيز 0.01 مولا ري وتحضن بدرجة حرارة 28±2 مْ .
4. قيست الامتصاصية للنموذج على طول موجي 495 nm لكل مدة 30 ثانية وعلى مدى ثلاث دقائق بعد ان يتم قراءة الامتصاصية على طول موجي .495nm .
5. وعبر عن فعالية الإنزيم بالتغير بالامتصاصية / دقيقة . غم وزن رطب اذ يتم حساب الـ PPO بتطبيق المعادلة ادناه :

$$\text{النشاط الانزيمي} = \frac{\text{قراءة الجهاز}}{(\text{وزن النموذج\حجم الاستخلاص}) \times \text{الحجم المأخوذ للقراءة}} \times 100$$

* النشاط الانزيمي (وحدة امتصاص\غم وزن رطب)

3-11-2: قياس فعالية انزيم البيروكسيديز الـ (POD) Peroxidase .

تم قياس فعالية انزيم البيروكسيديز حسب طريقة Hammerschmidt و Kuc (1982) حسب الخطوات الاتية :

1. خلط 1غم من النموذج مسحوق أوراق نبات الخيار وبشكل متجانس في 20 مل من الدارىء الفوسفاتي Sodium Phosphate Buffer بتركيز 0.1 مولاري وPH =7 .
2. رشح خلال اربع طبقات من قماش الشاش (موسلين)
3. وضع في جهاز الطرد المركزي المبرد بقوة 16000 دورة فى الدقيقة لمدة خمس عشرة دقيقةً وبدرجة حرارة 4 مْ .
4. اهمل الراسب و أخذ الراشح (مستخلص الأنزيم) واضيف اليه 1.5 مل من Pyrogallol كمادة أساس بتركيز 0.05 مولاري الى 0.5 مل من المستخلص واضيف اليه أيضا 0.5 مل من H_2O_2 بتركيز 1% وتحضن بدرجة حرارة 25 ±2

5. قيست الامتصاصية للنموذج على طول موجي 420 nm كل 30 ثانية لمدة ثلاث دقيقة يتم حساب الـ P.O.D بعد قراءة الامتصاصية على طول موجي 420nm .
6. عبر عن الفعالية الإنزيمية كتغير في الكثافة الضوئية / دقيقة. غم وزن رطب وبتطبيق المعادلة:

$$\text{النشاط الانزيمي} = \frac{\text{قراءة الجهاز}}{(\text{وزن النموذج}\backslash\text{حجم الاستخلاص}) \times \text{الحجم المأخوذ للقراءة}} \times 100$$

* النشاط الانزيمي (وحدة امتصاص\غم وزن رطب)

3-11-3: قياس فعالية الفينولات الكلية .

قيست الفينولات حسب طريقة Singleton و Rossi ، (1965) و Jakopic وveberic ، (2009) و Houssien ، (2010) وذلك حسب الخطوات الاتية :

1. أخذ 100ملغم من الوزن الطري لاوراق نبات الخيار في أنبوبة اختبار واضيف اليه 200 مل من الميثانول وضعت في حمام Ultrasonic bath لمدة 45 دقيقة للاستخلاص .
2. اخذت 100 µL من المستخلص واضيفت اليه 5 مل من الماء المقطر مرتين و500µL من كاشف فولن Folin – Ciocalteau .
3. ترك النموذج لمدة من 30 ثانية وبعدها اضيف للنموذج 1.5 مل من محلول كاربونات الصوديوم بتركيز W/v %20 ثم ترك لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 40مْ
4. واخذ 5 مل في خلية زجاجية وتم قياس الفينولات بجهاز الاسبكتروفوتومتر بطول موجي 765 nm
5. حضر منحنى المعايرة (Calibration Curve) باستخدام سلسلة تركيز لحامض Gallic Acid .

12-3: تاثير راشح عزلات الفطر *Trichoderma* sp. في النمو القطري لعزلات الفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA مختبريا .

لتهيئة وتحضير الراشح الفطري الخاص بعزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* sp. المنتخبة ، تم تجهيز وسط البطاطا سكروز السائل Potato Sucrose Broth (P.S.B) مختبريا ، وعقم الوسط في جهاز التعقيم البخاري تركت لحين وصول درجة الحرارة 45 مْ وقبل التصلب ثم اضيف إليه المضاد الحيوي Chloramphinicol ثم وضع في انابيب اختبار بلاستيكية مغلقة سعة 100مل لقحت كل منها ب3 اقراص (0.5 سم) من كل العزلات الفطرية وبشكل منفرد ، اخذت من مستعمرات بعمر سبعة ايام تم تنميتها على وسط PDA وبواقع 10 انابيب/ عزلة فطرية ، بعد ذلك وضعت بالحاضنة على درجة حرارة 25 ± 2º لمدة خمسة عشر يوما ثم حفظت في الثلاجة لحين الاستخدام .

بعدها رشح الوسط بواسطة ورقة ترشيح (whatman filter paper No.4) ، ثم أجريت عملية الطرد المركزي ،و اخذ الراشح ووضع في أنبوبة اختبار في جهاز الطرد المركزي على سرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة خمس دقائق ، ثم عقم الرائق باستخدام مرشح دقيق (mellipore) قياس 0.22 ملي مايكرون . (Konda , 2018)

اضيف راشح كل عزلة فطرية بواقع 2 مل الى اطباق بتري ثم صب فوقها 10 مل من الوسط الغذائي PDA مع تحريك الاطباق حركة رحوية لمجانسة الراشح مع الوسط ، وبعد تصلب الوسط لقح مركز كل طبق بقرص قطره 0.5 سم اخذ من مزرعة حديثة للفطريات الممرضة *Fusarium* sp. ، *Sclerotinia* sp. , *Rhizoctonia* sp. ، *Pythium* sp. عملت ثلاثة مكررات لكل معاملة مع الاخذ بنظر الاعتبار وجود معاملة السيطرة التي كانت P.D.A. + 2مل ماء مقطر معقم فقط، وضعت المعاملات في الحاضنة ، على درجة حرارة 25 ± 2 مْ وبعد ان اكتمل نمو مقارنة كل عزلة فطرية ، تم قياس النمو القطري للفطريات الممرضة . باخذ معدل نمو قطرين متعامدين يمران من مركز الطبق ، والنسبة المئوية للتثبيط حسب المعادلة الاتية :

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{معدل قطر المستعمرة بالسيطرة} - \text{معدل قطر المستعمرة بالمعاملة}}{\text{معدل قطر المستعمرة بالسيطرة}} \times 100$$

3-13: الكشف عن قابلية عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* sp. المنتخبة على انتاج السم الفطري Gliotoxin.

3-13-1: استخلاص السم الفطري Gliotoxin من مزارع العزلات الفطرية .

للكشف عن قابلية عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* spp. على انتاج السم الفطري Gliotoxin ، تم تنمية هذه العزلات على وسط الرزوالمحضر حسب الطريقة المذكورة في الفقرة 2-3-5 ، اذ تم وضع خمسة أقراص قطر كل منها 0.5 سم من فطر *Trichoderma* sp. في كل كيس يحوي 250 غم من الوسط ، أخذت من حافة مزرعة الفطر بعمر سبعة ايام حضن وسط الرز المعامل بالعزلات الفطرية لمدة 21 يوماً على درجة حرارة 25 ± 2 مْ ، مع تعرضها ظروف الاجهاد لتحفيزها على انتاج مركبات الايض الثانوي مثلا تعريضها الى درجات حرارة منخفضة لمدة اربع دقائق اسبوعيا وكذلك تحريك الوسط كل يومين الى ثلاثة أيام لضمان توزيع الفطر على جميع اجزاء الوسط .

تم اخذ 10 غم من مستعمرة الفطر *Trichoderma* sp. المنمى على وسط الرز واضافته الى 50 مل في ماء مقطر معقم في دورق زجاجي وترك لمدة 24 ساعة مع التحريك المستمر ، ثم يتم استخلاص السم الفطري بوضع الدورق على المازج المغناطيسي لمدة ساعتين من المزج المتواصل ، بعد ذلك رشح الخليط باستخدام ورق ترشيح واضيف له محلول الفصل المكون من ميثانول، كلوروفورم ، خلات الاثيل (3:2:1) رج جيدا وترك لمدة 24 ساعة بعدها عرض الى عملية الطرد المركزي لمدة دقيقتين على سرعة 2000 دورة / دقيقة و اخذ الطافي بواسطة الماصة ونقل الى انابيب خاصة معتمة وترك ليجف لعدة ايام ثم اذيب المستخلص بإضافة 2مل من الكحول المثيلي (Carberry واخرون ، 2012) .

3-13-2: التقدير الكمي والنوعي لسم Gliotoxin باستخدام تقانة كروموتوكرافيا السائل فايق الأداء High Performance Liquid (HPLC) Chromatography لمستخلص عزلات الفطر *Trichoderma sp* .

اجرى التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Gliotoxin بجهاز الـ HPLC التابع لمختبرات كلية الصيدلة / جامعة كربلاء ، وتم استعمال مذيب الميثانول واستعمل العمود Inertsil ODS-SP بمعدل جريان 1.0 مل/دقيقة والطول الموجي 254 نانومتر وحساسية الجهاز 0.01 AUFS استعمل طور متحرك من خليط مكون(50 : 50) الميثانول : الماء ،

حضر محلول السم الفطري القياسي للـ Gliotoxin التركيز 500 مايكروغرام/مل من الـGliotoxin أذيب بـ 2 مل من خليط الميثانول: ماء (1:1) عوملت جميع مستخلصات العزلات الفطرية بالطريقة نفسها المنماة على وسط الرز وذلك لغرض التقدير الكمي والنوعي للـGliotoxin المنتج من هذه العزلات وذلك باستعمال تقانة الـ HPLC.

14-3: التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية المنتخبة التابعة للفطر *Trichoderma* spp.

تم التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. التي أظهرت مقدرة تضادية عالية ضد الفطريات الممرضة ، وهي 11 عزلة فطرية ، تم التشخيص الجزيئي لهذه العزلات عن طريق تحليل تسلسل قواعد الحامض النووي (DNA) ومقارنتها بجينوم العزلات المشخصة مسبقا وتشخيصها اذ ارسلت هذه العزلات الى شركة Macrogen كورية الجنوبية لغرض تحديد التتابع النيوكلوتيدي للمنطقة الجينية SSU لجميع هذه العزلات .

وبعد استلام التتابعات النيوكلوتيدية والتشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية ، حللت التتابعات النيوكلوتيدية بأستخدام برنامج (BLAST)Basic Local Aligment Search Tool ، لمقارنتها مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية National Center For Biotecnology Information (NCBI) ضمن بنك الجينات الالكتروني والتي تعود للعزلات الفطرية نفسها والتي تم تشخيصها عالميا، وسجلت العزلات الفطرية التي لم تطابق اي من التتابعات النيوكلوتيدية 100% في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) ، كما اجريت التحاليل النيوكليوتيدية باستعمال برنامج MEGA لتحليل العزلات ورسم شجرة القرابة بين كل من هذه العزلات والعزلات المشابهة لها المسجلة بمركز NCBI ضمت شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining التي تم بناؤها من التسلسل الجزيئي النيوكليوتيدي لمنطقة SSU العائدة لكل من العزلات .

جدول (6) : ترميز عزلات الفطر *Trichoderma* spp. التي اظهرت مقدرة تضادية عالية وتم ارسالها الى شركة Macrogen الكورية الجنوبية للتشخيص الجزيئي .

ت	رمز العزلة الفطرية	العينة التي جمعت منها	رمز ID الارسال
1	T.B4	بغداد \البياع \نبات زينة	YSh.B4
2	T.B10	بغداد \ الجامعة المستنصرية \ نخيل	YSh.B10
3	T.D7	ديوانية \ شامية \سدر	YSh.D7
4	T.D9	ديوانية \ اطراف \ أشجار زينة	YSh.D9
5	T.H7	بابل \ السدة \ مشمش	YSh.H7
6	T.H8	بابل \ الكفل \ خضر	YSh.H8
7	T.K8	كربلاء \ الحر \ خضر	YSh.K8
8	T.N4	نجف \ عباسية \ ذرة بيضاء	YSh.N4
9	T.N9	نجف \ مفرك الكفل \ خضر	YSh.N9
10	T.M2	موصل \ الشورة \ نبات زينة	YSh.M2
11	T.R10	كركوك \ طوز خورماتو \ مشمش	YSh.R15

3ـ 15 : الخصائص الكيميائية للتربة Soil chemical properties المعزول منها عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* sp. المنتخبة .

3-15-1: قياس درجة تفاعل التربة (PH) .

قدرت درجة تفاعل التربة في عالق التربة المعزول منها عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* sp. المنتخبة (تربة : ماء) بنسبة (1:1) باستخدام جهاز pH-meter نوع HANAموديل HI98107 على وفق ما هو موصوف Emmerich وآخرون (1982).

3-15-2: قياس التوصيلية الكهربائية (E.C) .

قيست الايصالية الكهربائية (E.C) عالق التربة المعزول منها عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* sp. المنتخبة (تربة : ماء) بنسبة (1:1) باستخدام جهاز E.C-meter نوع HANA موديل HI98304 على وفق ما هو موصوف Emmerich وآخرون(1982).

3-15-3: قياس الكاربون العضوي والمادة العضوي .

قدر الكاربون العضوي في العينات بطريقة الاكسدة الرطبة وحسب طريقة Walklyو Black الموصوفة في Jackson (1958) ثم حسبت المادة العضوية وذلك بأكسدة نموذج التربة بواسطة $K_2Cr_2O_7$ 1عياري وحامض الكبريتيك المركز والتسحيح مع كبريتات الحديدوز الامونياكي $FeSO_4.NH_4$ 1 عياري ، ثم ضربت النسبة المئوية للكاربون العضوي بالمعامل 2.676 للحصول على النسبة المئوية للمادة العضوية ، وحسب الخطوات الاتية :

1- وضع 0.5 غم من عينة التربة المنخولة (0.2 ملم) في فلاسك (دورق سعة 500 مل)
2- اضيف 10 مل من 1 عياري داي كرومات البوتاسيوم $k_2Cr_2O_7$.
3- رج بهدوء ثم يضاف 20 مل من حامض H_2SO_4 (حامض الكبريتيك) المركز ويرج لمدة دقيقة واحدة ثم يترك لمدة نصف ساعة .
4- خفف المحلول بإضافة 160 مل من الماء المقطر .
5- اضيف 10 مل من حامض الفسفوريك H_3PO_4 تركيزه 85% .
6- اضيف 0.2 غم من فلوريد الصوديوم NaF .
7- اضيف 30 قطرة من كاشف دليل (داي فنيل امين) حيث يصبح لون المحلول أزرقاً مخضراً .
8- عمل بلانك Blank وذلك باتباع الخطوات الانفة جميعها عدا عم إضافة نموذج التربة .
9- سحح المحلول لعينة التربة وكذلك Blank مع كبريتات الحديدوز الامونياكية Fe $(NH4)_2$ (H2O)6 ، (SO4)2) الوزن الجزئي لها = 392.14 ويستمر بالتسحيح لحين تحول اللون من الأزرق المخضر الى الأخضر الفاتح .

وقدرت قيمة النسبة المئوية للمادة العضوية في التربة وفقا للمعادلة الاتية :

$$OM\ \% = 10\ (1-\frac{T}{S}) \times 2.676$$

OM تعني النسبة المئوية للمادة العضوية في التربة .

T تعني الحجم المستهلك من كبريتات الحديدوز في عينة التربة .

S تعني الحجم المستهلك من كبريتات الحديدوز في Blank .

1.72 تعني نسبة الكاربون في المادة العضوية = 58% .

1.34 تعني قيمة عيارية داي كرومات البوتاسيوم .

16-3: اختبار التوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin ومركبات الاستحثاث ضد العزلات الفطرية الممرضة .

تم اجراء هذا الاختبار على عدد من العزلات الفطرية للفطر *Trichoderma* spp. تم انتخابها سابقا بعد اثبات قدرتها التضادية باختبار المقدرة التضادية مختبريا وفي الاصص البلاستيكية في البيت البلاستيكي ضد الفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA وبسبب امتلاكها المقدرة على انتاج السم الفطري Gliotoxin بتراكيز مرتفعة نسبيا ولها القدرة على استحثاث المقاومة الجهازية في النبات .

1-16-3: اختبار التضاد الحيوي لعدد من عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin ومركبات الاستحثاث فيما بينها مختبريا على وسط PDA .

تم أجراء هذا الاختبار على خمس عزلات فطرية وهي T.B4,T.D9,T.H7,T.N4,T.M2 من اصل 11 عزلةً للفطر *Trichoderma* spp. تم انتخابها سابقا بعد اثبات قدرتها التضادية باختبار المقدرة التضادية مختبرياً وفي الاصص البلاستيكية في البيت البلاستيكي ضد الفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA ولها المقدرة على انتاج السم الفطري Gliotoxin بتراكيز مرتفعة نسبياً ولها القدرة على استحثاث المقاومة الجهازية في النبات، اذ اجري هذا الاختبار للكشف عن امكانية اتحاد اكثر من عزلة فطرية بدون اي مؤشرات تضاد حيوي فيما بينها ، وانتخاب 3 عزلات من اصل 5 عزلات بالامكان عمل توليفه منها وتقييم تأثيرها التأزري ضد الفطريات الامراضية .

تم الكشف عن التضاد بين العزلات الفطرية وبطريقة الزرع المزدوج اذ قسم طبق بتري قطره 9سم حاوي على الوسط الزرعي PDA إلى ثلاثة اقسام متساوية ، ولقح مركز كل قسم من الطبق بقرص قطره 0.5 سم من عزلة الفطر *Trichoderma* spp. وبعمر سبعة أيام (جدول7). نفذت التجربة بواقع ثلاثة مكررات، وضعت الأطباق في حاضنة على درجة حرارة 25±1 م° لمدة أسبوع واحد وقد تم تقدير المقدرة التضادية بوجود مناطق التضاد بين العزلات .

جدول (7) المعاملات التضادية بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتخبة

ت	رمز العزلة الفطرية	رمز العزلة الفطرية	رمز العزلة الفطرية
المعاملة 1	T. B4	T.N4	T.H7
المعاملة 2	T. B4	T.N4	T.M2
المعاملة 3	T. B4	T.N4	T.D9
المعاملة 4	T. M2	T.N4	T.D9
المعاملة 5	T. H7	T.N4	T.D9

* كل معاملة بواقع ثلاثة مكررات .

3-16-2: اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin ومركبات الاستحثاث ضد العزلات الفطرية الممرضة حقلياً في الاصص البلاستيكية .

تم اجراء هذا الاختبار على ثلاث عزلات فطرية للفطر *Trichoderma* spp. تم انتخابها في الفقرة 3-6-1 فضلا عن اثبات قدرتها التضادية باختبار المقدرة التضادية مختبريا وحقليا ، ضد الفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA ولها المقدرة على انتاج السم الفطري Gliotoxin بتراكيز مرتفعة نسبياً ولها القدرة على استحثاث المقاومة الجهازية في النبات ولم تظهر اي مؤشرات تضاد حيوي فيما بينها .

ولإجراء هذه التجربة تم تعقيم تربة مزيجية بواسطة جهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121°م وضغط 15 باوند/إنج^2 لمدة ساعة وليومين متتاليين ثم وضعت في اصص بلاستيكية سعة 1 كغم ورطبت بالماء ، عوملت التربة بفطر *Trichoderma* spp. بشكل مفرد ومتحدة والمنمى على بذور الرز بوضع 10 غم (بشكل كلي) ولثلاثة مكررات لكل عينة وتم زرع بذور الخيار المعقمة سطحيا 10 بذرة \ اصص وبعد ثلاثة أيام تم وضع الفطر الممرض (10غم) لكل اصيص المنمى على وسط الدخن :

1. معاملة1 (المقارنة1) بدون اضافة أي فطر .
2. معاملة 2 (المقارنة2) اضافة الممرض فقط *Rhizoctonia* sp. .
3. معاملة 3 (المقارنة3) اضافة الممرض فقط *pythium* sp. .
4. معاملة 4 (المقارنة4) اضافة الممرض فقط *Fusarium* sp. .
5. معاملة 6 اضافة العزلة (T. N4) + *Rhizoctonia* sp. .

6. معاملة 7 اضافة العزلة (T. N4) + *pythium* sp. .
7. معاملة 8 اضافة العزلة (T. N4) + *Fusarium* sp.
8. معاملة 10 اضافة العزلة (T. M2) + *Rhizoctonia* sp. .
9. معاملة 11 اضافة العزلة (T. M2) + *pythium* sp. .
10. معاملة 12 اضافة العزلة (T. M2) + *Fusarium* sp. .
11. معاملة 14 اضافة العزلة (T. B4) + *Rhizoctonia* sp. .
12. معاملة 15 اضافة العزلة (T. B4) + *pythium* sp. .
13. معاملة 16 اضافة العزلة (T. B4) + *Fusarium* sp. .
14. معاملة 18 اضافة العزلة (T. N4) + (T. B4) + *Rhizoctonia* sp. .
15. معاملة 19 اضافة العزلة (T. N4) + (T. B4) + *pythium* sp. .
16. معاملة 20 اضافة العزلة (T. N4) + (T. B4) + *Fusarium* sp. .
17. معاملة 22 اضافة العزلة (T. N4) + (T. M2) + *Rhizoctonia* sp.
18. معاملة 23 اضافة العزلة (T. N4) + (T. M2) + *pythium* sp. .
19. معاملة 24 اضافة العزلة (T. N4) + (T. M2) + *Fusarium* sp. .
20. معاملة 26 اضافة العزلة (T. M2) + (T. B4) + *Rhizoctonia* sp. .
21. معاملة 27 اضافة العزلة (T. M2) + (T. B4) + *pythium* sp. .
22. معاملة 28 اضافة العزلة (T. M2) + (T. B4) + *Fusarium* sp. .
23. معاملة 30 اضافة العزلة (T. M2) + (T. B4) + (T.N4) + *Rhizoctonia* sp. .
24. معاملة 31 اضافة العزلة (T. M2) + (T. B4) + (T.N4) + *pythium* sp. .
25. معاملة 32 اضافة العزلة (T. M2) + (T. B4) + (T.N4) + *Fusarium* sp. .

- تم قياس النسبة المئوية لحدوث المرض بعد أسبوعين من الزراعة وفق المعادلة التالية:

$$\text{النسبة المئوية للاصابة} = \frac{\text{عدد النباتات المصابة}}{\text{العدد الكلي للنباتات}} \times 100$$

- تم قياس النسبة المئوية لشدة المرض حسب معادلة Mckinney (1923) وكما يأتي :

$$\text{لشدة المرض} = \frac{\text{مجموع (عدد النباتات لكل درجة} \times \text{رقم الدرجة)}}{\text{العدد الكلي للنباتات} \times \text{أعلى درجة}} \times 100$$

- وتم حساب النسبة المئوية لشدة الاصابة في نباتات الخيار باستعمال الدليل المرضي المكون من خمس درجات ، وكما يأتي:

0 = عدم وجود اي تعفن او تلف بالجذور (النبات سليم) .

1= تعفن وتلف اكثر من 0 – 25 % من الجذور .

2= تعفن وتلف اكثر من 25 – 50 % من الجذور وظهور ذبول بسيط على النبات .

3= تعفن وتلف اكثر من 50 – 75 % من الجذور وذبول وتدهور النبات .

4= تعفن وتلف اكثر من 75 – 100 % من الجذور او موت النبات .

17-3 : التصاميم الإحصائية للتجارب المختبرية والحقلية .

استعمل التصميم تام التعشية Complete randomized design (CRD) لجميع التجارب التي اجريت تحت ظروف مسيطر عليها (التجارب المختبرية وتجارب البيوت البلاستيكية)، وحللت البيانات ببرنامج Statistical Analysis System (SAS) ، بعد تحويل النسب المئوية الى التحويل الزاوي ، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار أقل فرق معنوي L.S.D. تحت مستوى معنوية 0.05 .

4-النتائج والمناقشة

4-1: العزل والتشخيص

بينت نتائج اختبارات العزل المايكروبايولوجية لعينات التربة وجذور وقواعد سيقان نباتات الخيار التي ظهرت عليها أعراض اصابة مختلفة مثل الذبول والاصفرار العام ، وجود العديد من الفطريات الممرضة والمترممة ومنها ما يستخدم بالمكافحة الاحيائية مثل الفطر *Trichoderma* spp. .

4-1-1: عزل وتشخيص فطريات *Trichoderma* spp. من عينات التربة

أظهرت نتائج العزل والتشخيص للفطريات المرافقة لعينات التربة والتي جمعت من مناطق مختلفة من عشرة محافظات من العراق وهي (كربلاء ،النجف ، بغداد ، بابل ، الديوانية ، الكوت ، الناصرية ، كركوك ، الموصل ، ديالى) وجود أنواع من الفطريات متعددة ومتباينة مترممات ومنها ما هو متطفل (ممرض) وغيرها مما يستخدم بالمكافحة الاحيائية وتعود إلى الأجناس الفطرية التالية (جـــــــــدول 8) *Aspergillus* spp. و *Penicillium* spp. و *Fusarium* spp. و *Rhizoctonia* spp. و *Rhizopus* spp. و *Trichoderma* spp. و *Mucor* spp. و *Alternaria* spp. وغيرها.

سجل الجنس *Aspergillus* spp. أعلى نسبة للظهور بلغت 100% ، وبنسبة تردد بلغت 18.11 % ، تلاه الجنس *Penicillium* spp. بنسبة ظهور بلغت 96 % وبنسبة تردد بلغت 17.39 . وتلاه الجنس *Fusarium* spp. ثم الفطر *Rhizoctonia* spp. ثم الفطر *Rhizopus* spp. ثم الفطر *Trichoderma* spp. بالمرتبة السادسة بنسبة مئوية للظهور بلغت 53 % وبنسبة تردد بلغت 9.60 اذ تم عزل 53 عزلة فطرية (4 كربلاء) (9 بابل) (8 ديوانية) (6 نجف) (4 بغداد) (8 ناصرية) (4 كركوك) (3 موصل) (3 ديالى) (3 كوت) عزلة لفطر *Trichoderma* spp. تم تشخيصها بالاعتماد على الصفات المظهرية للفطر والمذكورة من قبل Shrestha ،(2019)

واهم ما يفسر وجود أنواع الفطر *Aspergillus* sp. بتردد عالي فقد يعزى بسبب كونه من الفطريات المستوطنة للتربة وذات انتشار واسع في المناطق الدافئة فضلاً عن إنتاجه إعداداً كبيرة من الوحدات التكاثرية كما أن بعض أنواعه لها أطوار جنسية أو أجسامٌ حجرية وهذا ما جعله

يتكيف مع الظروف أو إلى التأثر بالأفرازات الجذرية أو ربما إلى نشاط وفعالية أنواع الفطر *Aspergillus* spp. (علوان ، 2005 والحيدري ، 2007) بينما أشار Van، (2013) ان الفطر *Fusarium* spp. يعد احد مسببات الأمراض النباتية المهمة التي تنتقل عن طريق التربة و له وجود واسع في جميع ترب العالم و مسؤول عن خسارة الانتاج النباتي في العديد من المحاصيل المختلفة و منها الحنطة و الذرة و اللوز و زهرة الشمس و كذلك بعض النباتات الطبية (Xia و اخرون 2018 وPunja و اخرون، 2018). في حين بينت الدراسات ان الفطر *Rhizoctonia* spp. له القابلية على التواجد في مختلف الترب بهيئة غزل فطري و أجسام حجرية و يمتاز الغزل الفطري بسرعة نموه في التربة و قدرة الأجسام الحجرية على البقاء في التربة لمدة قد تصل إلى ست سنوات (Eken وDemirc، 2003) .

بينما اكد Das واخرون ، (2019) بان الفطر *Trichoderma* spp. كونه من الفطريات المستوطنة للتربة وذات انتشار واسع بسبب إنتاجه إعدادا كبيرة من الوحدات التكاثرية وهذا ما جعله يتكيف مع الظروف البيئية وبمختلف الترب وخاصة في مناطق المحيط الجذري إذ تستعمر الجذور لتوفير الحماية للنبات ضد المسببات المرضية المختلفة ، كما تستخدم بعض انواع الفطر *Trichoderma* spp. آلية Mycoparasitism و هي من اكثر الآليات التي يلازمها انتاج الانزيمات المحللة للجدار الخلوي الخاص بالمسببات المرضية ومنها الفطر *T.harzianum* و *T.virens* التي كانت مرافقة للترب المحيطة للجذور المصابة وكانت فعالة في السيطرة على المسببات ألمرضية .

وكذلك تتفق هذه الدراسة مع دراسات اخرى اكدت بان انواع الفطر *Trichoderma* spp. من اهم احياء التربة تواجدا ونشاطا ضد مجموعة واسعة من الكائنات المسببة للأمراض النباتية اذ يكون توجدها بشكل شائع في غالبية أنواع الترب والبيئات المختلفة (Pimentel واخرون، 2020) . وهو من الفطريات حرة المعيشة اذ يوجد بصورة واسعة في التربة والنظم البيئية الجذرية ويتميز بارتباطه الوثيق بجذور النباتات ، وقدرته في تحسين نمو الجذور وتطورها وانتاجية المحاصيل ومقاومة الظروف البيئة المختلفة وامتصاص المغذيات (Ruangwong واخرون ،2021) .

جـدول(8) : يوضـح العـزلات الفطريـة المرافقـة لعينـات التربـة المجموعـة مـن محافظـات العراق

ت	اسم الفطر	النسبة المئوية للظهور%	النسبة المئوية للتردد%
1	*Aspergillus* spp.	100.00	18.11
2	*Penicillium* spp.	96.00	17.39
3	*Fusarium* spp.	83.00	15.03
4	*Rhizoctonia* spp.	65.00	11.77
5	*Rhizopus* spp.	56.00	10.14
6	*Tricoderma* spp.	53.00	9.60
7	*Mucor* spp.	37.00	6.70
8	*M.phaseolina*	30.00	5.43
9	*Alternaria* spp.	12.00	2.19
10	*Verticillum* spp.	10.00	1.81
11	فطر عقيم ابيض	8.00	1.44
12	*.Pythium* spp.	2.00	0.36

*** كل رقم في الجدول يمثل معدل اربعة مكررات**

4-1-2: عزل الفطريات الممرضة المرافقة لنباتات الخيار المصابة .

بينت نتائج العزل والتشخيص لعينات التربة وجذور وقواعد سيقان نباتات الخيار التي ظهرت عليها أعراض اصابة مختلفة مثل الذبول والاصفرار العام ، وجود العديد من الفطريات الممرضة اذ سجل الجنس .*Fusarium* spp أعلى نسبة للظهور بلغت 40% ، وبنسبة تردد بلغت 28.57 % ، وان ظهور هذا الفطر بأعلى تكرار يتفق مع دراسات سابقة ، فان الفطر .*Fusarium* spp يعد احد مسببات الأمراض النباتية المهمة التي تنتقل عن طريق التربة و له وجود واسع في جميع ترب العالم و مسؤول عن خسارة الانتاج كماً و نوعاً في العديد من المحاصيل المختلفة (Xia و اخرون 2018 وPunja و اخرون، 2018). وان للفطر قدرة عالية على مهاجمة جذور العديد من النباتات تحت سطح التربة و ايضا اصابة السيقان و الاوراق و باعراض تظهر بهيئة تعفن في منطقة التاج و تلون بني في الحزم الوعائية و تبقع في الاوراق (Eugenia واخرون ، 2019 و Stack واخرون 2017 و Shan واخرون ،2017).

اما الفطرين *Rhizoctonia* spp. و *M.phaseolina* بالمرتبة الثانية حيث بلغت نسبة الظهور 30 % ونسبة تردد بلغت 21.42 % فقد بينت الدراسات السابقة بان الفطر *R.solani* يعد واحداً من اهم المسببات المرضية لموت البادرات و تعفن البذور و يتواجد في كافة إنحاء العالم وبمدى عائلي قد يصل إلى أكثر من 500 نوع نباتي و 125 جنس تنتمي لعوائل نباتية مختلفة و يصيب الفطر عوائل نباتية في جميع مراحل نموها فيصيب البذور والجذور و يسبب تعفنها كما أنه يسبب موت البادرات قبل و بعد البزوغ محدثا خسائر اقتصادية كبيرة و أن الفطر *R.solani* هواحد المسببات المرضية للعديد من النباتات مثل الخيار و الطماطة واللهانة والبطاطا و الباميا و الباذنجإن و غيرها مسببا لها تعفن البذور و موت بادراتها (حسون، 2005 و Kareem و Hassan، 2013 و Foda وLoizou ، 2019) .

يهاجم الفطر *R.solani* الأجزاء النباتية النامية تحت وفوق سطح التربة مثل البذور والجذور و البادرات و السيقان و الأوراق و البراعم و الثمار (العبيدي ،2019) تعد ظاهرة عدم إنبات البذور المصابة واحدة من اهم الأعراض المرضية كما و يسبب الفطر ظهور تقرحات على البادرات المصابة غير الميتة و بشكل تقرحات بنية غائرة محمرة على منطقة الساق المصابة و القريبة من سطح التربة (Ogoshi، 1996).

جدول(9) : يوضح العزلات الفطرية المرافقة جذور وقواعد سيقان نباتات الخيار

ت	اسم الفطر	عدد العزلات	النسبة المئوية للظهور%	النسبة المئوية للتردد%
1	*Fusarium* spp.	4	% 40	28.57
2	*Rhizoctonia* spp.	3	% 30	21.42
3	*M.phaseolina*	3	% 30	21.42
4	*Alternaria* spp.	2	% 20	14.28
5	*Pythium* sp.	1	% 10	7.14
6	*Phytophthora* sp.	1	% 10	7.14

2-4: اختبارات المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *Fusarium* spp. و *Rhizoctonia* spp. و *Pythium* spp. و *Sclerotinia* sp. باستخدام بذور اللهانة مختبرياً .

أظهرت نتائج القدرة الامراضية مختبريا (جدول 10) ان جميع الفطريات أدت الى خفض معنوي في النسبة المئوية للانبات قياسا بمعاملة المقارنة التي بلغت النسبة المئوية لانبات بذور اللهانة فيها (93.33) % تفوقت احدى عزلات الفطر *Fusarium* sp. في خفض النسبة المئوية للانبات عن باقي الفطريات اذ بلغ معدل النسبة المئوية فيها 16.66%و كانت النسبة المئوية لاعلى عزلة من الفطر *Rhizoctonia* sp. بنسبة 53.33% ، تلاها الفطر *Pythium* sp. 46.66% بينما كانت اقل نسبة تأثير على الانبات للفطر *Sclerotinia* sp. والتي بلغت 30.00% شكل (1) .

قد يعزى سبب التباين في المقدرة الأمراضية لهذه العزلات 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 احداث الاصابة (Stepien وChelkowski، 2010). كما أشارت دراسات عديدة الى أنَّ الانواع الفطرية الممرضة تمتاز بقدرتها العالية على انتاج بعض الانزيمات مثل Protase و Pectolytic و Cutinase و Celluloytic enzymes ، الذي قد يؤدي الى اختلافها في طبيعة المركبات الأيضية السامة المنتجة و كذلك الأنزيمات المحللة للبكتين و السليلوز وغيرها التي قد تعمل بشكل منفرد أو مشترك في منع انبات البذور (Lozovaya و اخرون، 2006 و Bhattacharya و اخرون، 2013).

شكل (1) : القدرة الامراضية للفطريات الممرضة *Fusarium* sp. ، *Rhizoctonia* sp. و *pythium* sp. باستخدام بذور اللهانةعلى الوسط الزرعي PDA بعد سبعة ايام وبدرجة حرارة 25 ± 2م°.

جدول(10) : يوضح اختبار القدرة الامراضية للفطريات المنتخبة باستخدام بذور اللهانة على وسط الاكار المائي (WA) مختبريا .

ت	المعاملة	النسبة المئوية للانبات %	النسبة المئوية لتثبيط الانبات %
1	*المقارنة*	**93.33**	**0.00**
2	*Fusarium* sp. (1)	**16.66**	**82.14**
3	*Fusarium* sp. (2)	**53.33**	**42.85**
4	*Fusarium* sp. (3)	**60.00**	**35.71**
5	*Fusarium* sp. (4)	**56.66**	**39.29**
6	*Rhizoctonia* sp. (1)	**26.66**	**71.43**
7	*Rhizoctonia* sp. (2)	**53.33**	**42.85**
8	*Rhizoctonia* sp. (3)	**53.33**	**42.85**
9	*Pythium* sp.	**46.66**	**50.00**
10	*Sclerotinia* sp.	**30.00**	**67.85**
	L.S.D 0.05	**11.45**	-----

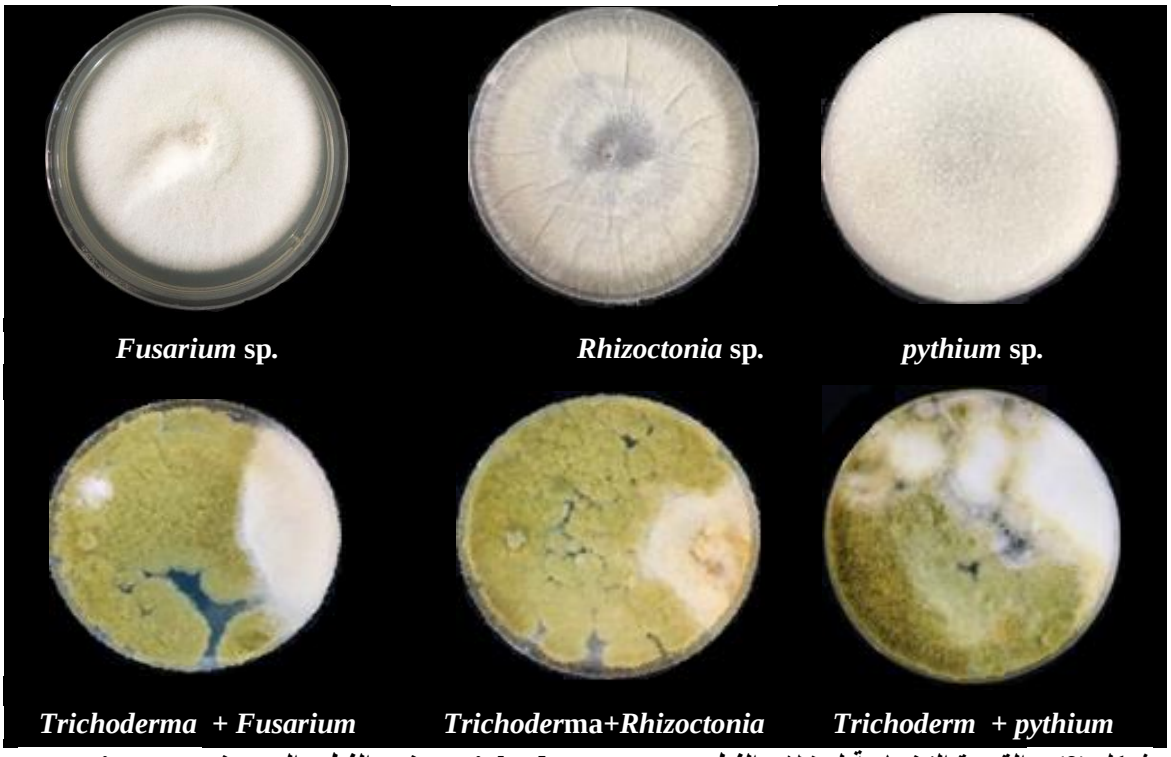
3-4 : اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد العزلات الفطرية الممرضة

تم إجراء أكثر من تجربة لاختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. المعزولة من ترب النباتات السليمة، لتحديد العزلات الفطرية الأكثر تضاد ضد المسببات المرضية المختلفة، لاستخدامها في التجارب البحثية اللاحقة واختبار مقدرتها على إنتاج السم الفطري Gliotoxin.

1-3-4: اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد العزلات الفطرية الممرضة مختبريا

تم اختبار القدرة التضادية لـ(53) عزلة من الفطر (جدول 11، 12 ، 13 ،14) *Trichoderma* spp. والتي شخصت بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية على أنَّها تعود للفطر *Trichoderma* spp. المعزولة من ترب النباتات السليمة ضد الفطريات الممرضة ،

فقد لوحظ وجود بعض الفروق المعنوية بين العزلات الفطرية المختبرة من حيث تأثيرها على النسبة المئوية للتثبيط . شكل (2)



شكل (2) : القدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *Fusarium* sp ، *Rhizoctonia* sp.و *pythium* sp. على الوسط الزرعي PDA بعد سبعة ايام وبدرجة حرارة 25 ± 2م°.

حققت عزلات الفطر *Trichoderma* spp. قدرة تضادية عالية ضد الفطريات الممرضة عند ظروف المختبر فكانت اعلى قدرة تضادية 90.73 %للعزلة الفطرية T.N4 واقل قدرة تضادية 27.33% للعزلة T.D3 ضد الفطر الممرض *Fusarium* spp. جدول (11).

ومن المعروف امتلاك الفطر*Trichoderma* spp القدرة على تثبيط نمو الفطريات الممرضة للنبات وذلك باستخدام آليات مختلفة مثل التطفل الفطري والتنافس على المكان والغذاء وإنتاج المواد المضادة للفطريات. (Verma واخرون، Kaewchai, 2007 ، 2009 ، سعاد، 2011) اذ بينت التجارب أن القدرة التضادية لفطر *T.harzianum* والذي تميز بكفاءة تضادية عالية ضد الفطر.*Fusarium* spp اذ وصلت درجة التضاد الى 2 لكل من الممرضات النباتية حسب مقياس Bell (العامري واخرون، 2018).

جـــدول(11) النســـبة المئويـــة للتثبـــيط لعـــزلات الفطـــر *Trichoderma* spp. ضـــد الفطرالممرض *Fusarium* spp. .

النسبة المئوية للتثبيط لعزلات الفطر Trichoderma spp. ضد الفطرالممرض *Fusarium* spp .								
ت	العزلة الفطرية *Trichoderma* .spp	% للتثبيط	ت	العزلة الفطرية *Trichoderma* .spp	%للتثبيط	ت	العزلة الفطرية *Trichoderma* .spp	%للتثبيط
1	T.B1	51.84	19	T.K3	61.10	37	T.D10	53.70
2	T.B6	72.21	20	T.K11	62.95	38	T.N2	53.70
3	T.B10	82.96	21	T.K10	57.40	39	T.N3	27.77
4	T.B4	85.55	22	T.H2	53.70	40	T.N4	90.73
5	T.M1	75.92	23	T.H3	79.62	41	T.N9	82.40
6	T.M2	85.17	24	T.H4	70.36	42	T.N10	62.95
7	T.M4	68.51	25	T.H5	77.77	43	T.N11	57.40
8	T.M8	57.40	26	T.H6	62.95	44	T.T2	68.51
9	T.S2	75.17	27	T.H7	79.62	45	T.T3	57.40
10	T.S3	77.95	28	T.H8	85.18	46	T.T7	62.95
11	T.S4	61.10	29	T.H9	57.40	47	T.E1	51.85
12	T.S5	72.21	30	T.D2	70.36	48	T.E2	48.14
13	T.S6	48.14	31	T.D3	27.33	49	T.E8	72.21
14	T.S7	37.03	32	T.D4	87.03	50	T.R2	74.07
15	T.S8	79.62	33	T.D5	75.92	51	T.R3	70.36
16	T.S10	68.69	34	T.D7	68.51	52	T.R8	72.21
17	T.K4	53.70	35	T.D8	57.40	53	T.R10	88.62
18	T.K8	79.62	36	T.D9	81.47	–	----	----
L.S.D 0.05	6.593							

*** كل رقم يمثل معدل ثلاثة مكررات**

واظهرت القدرة التضادية لفطر *Trichoderma* spp. جدول (12) ضد الفطر الممرض *Pythium* sp. نسبة تثبيط عالية اذ كانت اعلى نسبة تثبيط 88.88 % للعزلة الفطرية T.M2 وكانت اقل نسبة تثبيط للعزلة T.B6 وبمقدار 20.36 %.

تنتج انواع الفطر *Trichoderma* spp. العديد من مركبات الايض الثانوي منها المضادات الحيوية مثل gilotoxin و virindin و trichodermine ، والتي ثبت أن لها نشاطًا مضادًا للفطريات للسيطرة على مسببات الأمراض المختلفة التي تنتقل عن طريق التربة مثل *Pythium* spp. التي تسبب امراضاً نباتية خطيرة على عوائل نباتية مختلفة بالنظر إلى نتائج البحوث الحديثة ، ويمكن الاستنتاج أن انواع *Trichoderma* spp. لها خاصية معادية في السيطرة على هذا المسبب (Kareem وAl-Araji، 2017 و Inovejas و Divina، 2018 والخفاجي، 2020) .

جدول (12) النسبة المئوية للتثبيط لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *Pythium* sp.

ت	النسبة المئوية للتثبيط لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطرالممرض *Pythium* sp.							
	العزلة الفطرية *Trichoderma spp*	النسبة % للتثبيط	ت	العزلة الفطرية *Trichoderma spp*	النسبة % للتثبيط	ت	العزلة الفطرية *Trichoderma spp*	النسبة % للتثبيط
1	T.B1	22.22	19	T.K3	62.96	37	T.D10	22.22
2	T.B6	20.36	20	T.K11	57.40	38	T.N2	53.69
3	T.B10	81.47	21	T.K10	74.07	39	T.N3	74.07
4	T.B4	87.03	22	T.H2	49.99	40	T.N4	87.03
5	T.M1	72.21	23	T.H3	33.32	41	T.N9	81.47
6	T.M2	88.88	24	T.H4	24.07	42	T.N10	70.36
7	T.M4	64.81	25	T.H5	40.73	43	T.N11	33.33
8	T.M8	57.40	26	T.H6	22.22	44	T.T2	44.44
9	T.S2	64.81	27	T.H7	77.77	45	T.T3	53.7
10	T.S3	66.66	28	T.H8	79.62	46	T.T7	68.51
11	T.S4	57.40	29	T.H9	57.40	47	T.E1	57.40
12	T.S5	62.95	30	T.D2	57.4	48	T.E2	57.40
13	T.S6	72.21	31	T.D3	49.99	49	T.E8	74.07
14	T.S7	68.69	32	T.D4	83.32	50	T.R2	70.36
15	T.S8	68.51	33	T.D5	49.99	51	T.R3	33.33
16	T.S10	57.40	34	T.D7	68.69	52	T.R8	68.51
17	T.K4	25.92	35	T.D8	55.55	53	T.R10	74.07
18	T.K8	85.17	36	T.D9	75.92		------	-----
L.S.D 0.05		5.978						

*** كل رقم يمثل معدل ثلاثة مكررات**

واظهرت نتائج جدول (13) القدرة التضادية لفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *Rhizoctonia* spp. اذ كانت اعلى نسبة تثبيط للعزلات H7,D4,R10 بلغت 87.03% وكانت اقل نسبة تثبيط للعزلة M4 بلغت 31.48 % .

وجد في دراسات سابقة قدرة انواع مختلفة من الفطر *Trichoderma* spp. في تثبيط نمو الكثير من الفطريات مثل الفطر *Rh.solani* بسبب امتلاكة آليات مختلفة في المكافحة و منها ظاهرة التطفل على خيوط الفطر الممرض و التنافس على المواد الغذائية و احتلال مكان الوجود و انتاج المضادات الحيوية المثبطة للعديد من انزيمات المسبب المرضي و كذلك قدرته على انتاج بعض المركبات السامة مثل Trichothecin و Gliotoxin و Viridin (Singh و اخرون، 2014). اثبتت كفاءة انواع الفطر *Trichoderma* spp. و منها الانواع المستخدمة في هذه الدراسة في مقاومة العديد من الفطريات الممرضة مثل *الفطر* *Rhizoctonia* sp. (Al-Fadhal

و اخرون، 2018 وSuleiman واخرون، 2019). أظهرت النتائج كفاءة أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في تثبيط نمو المسبب الممرضي *R.solani* على نبات الخيار عند استخدمها بشكل منفرد و ازدادت نسب التثبيط للفطر الممرض معنوياً عند وجود اكثر من نوع من أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في الوسط الزرعي (PDA) نفسه قياسا بمعاملة المقارنة للفطر الممرض لوحظ أن اعلى نسبة لتثبيط نمو الفطر الممرض 100% كانت عند وجود العزلتين 1 و3 و التي لم تختلف معنوياً عن نسبة التثبيط 97% للفطر الممرض عند وجود عزلات الفطر *Trichoderma* spp. 1 و2 و 3 و 4 و5 تلتها نسبة التثبيط 88.8% التي تحققت عند وجود عزلتي الفطر *Trichoderma* spp. 1 و 5، في حين وجد أن اقل نسبة تثبيط 49% للفطر الممرض كأنت عند وجود عزلتي الفطر 2 و 4 (فالح، 2021) يعد الفطر *Trichoderma* spp. من فطريات المكافحة التي تمتلك آليات مختلفة في مقاومة المسببات المرضية الفطرية منها *Rh.solani* و *Fusarium* spp. و من تلك الآليات هي التطفل على خيوط الفطر الممرض و المنافسة على البيئة الغذائية وأنتاج بعض المضادات الحيوية ذات التأثير المثبط لبعض أنزيمات الفطر الممرض ، فضلا عن قابليته على أنتاج بعض المركبات الكيميائية ذات التأثير السام مثل Gliotoxin و Trichothecin و Viridin (Singh و اخرون، 2014).

جـــدول(13) النســـبة المئويـــة للتثبـــيط لعـــزلات الفطـــر *Trichoderma* spp. ضـــد الفطرالممرض *Rhizoctonia* sp. .

النسبة المئوية للتثبيط لعزلات الفطر Trichoderma spp. ضد الفطرالممرض *Rhizoctonia sp* .								
ت	العزلة الفطرية *Trichoderma spp*	النسبة % للتثبيط	ت	العزلة الفطرية *Trichoderma spp*	النسبة % للتثبيط	ت	العزلة الفطرية *Trichoderma spp*	النسبة % للتثبيط
1	T.B1	57.40	19	T.K3	59.25	37	T.D10	75.92
2	T.B6	57.40	20	T.K11	33.33	38	T.N2	72.21
3	T.B10	77.77	21	T.K10	51.85	39	T.N3	64.99
4	T.B4	83.32	22	T.H2	48.14	40	T.N4	87.03
5	T.M1	57.40	23	T.H3	72.21	41	T.N9	72.21
6	T.M2	70.36	24	T.H4	48.14	42	T.N10	70.36
7	T.M4	31.48	25	T.H5	57.40	43	T.N11	33.33
8	T.M8	62.96	26	T.H6	57.40	44	T.T2	55.55
9	T.S2	61.10	27	T.H7	87.03	45	T.T3	75.92
10	T.S3	75.92	28	T.H8	74.25	46	T.T7	68.51
11	T.S4	68.51	29	T.H9	68.51	47	T.E1	57.40
12	T.S5	57.40	30	T.D2	64.81	48	T.E2	74.07
13	T.S6	74.07	31	T.D3	75.92	49	T.E8	72.21
14	T.S7	66.66	32	T.D4	87.03	50	T.R2	61.10
15	T.S8	72.21	33	T.D5	72.21	51	T.R3	72.21
16	T.S10	48.14	34	T.D7	59.25	52	T.R8	48.14
17	T.K4	51.85	35	T.D8	44.44	53	T.R10	87.03
18	T.K8	75.92	36	T.D9	61.10		---------	-----
L.S.D 0.05		6.453						

*** كل رقم يمثل معدل ثلاثة مكررات**

وبينت النتائج أن القدرة التضادية لفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *Sclerotinia* sp. حققت نسبة تثبيط عالية اذ كانت اعلى نسبة تثبيط 88.88 % للعزلة الفطرية T.H7و T.M2 وكانت اقل نسبة تثبيط للعزلة T.S6 و T.T2 وبمقدار 20.36% جدول (14) إنَّ عزلة الفطر*T.harzianum* تمتلك كفاءةً عاليةً في تثبيط نمو الممرض *S. sclerotiorum* اذ أعطت درجة تضاد واحدة ضمن مقياس Bell فضلاً عن باقي العوامل الاحيائية المختبرة *T.viride* و *T.ressei* التي اظهرت درجتين تضاد بينما الفطر *T.longibrachium* اعطى قدرة تطفلية ضعيفة ضد الفطريات الممرضة (Sulaiman وYouns ، 2019) ، أظهر أيضًا أن عوامل المكافحة الحيوية *T. harzianum* (A1) و *T. viride* (A2) قد حققت انخفاضًا في معدل الإصابة وشدة الإصابة بالعفن الرمادي على الطماطم (صنف وجدان) والباذنجان (صنف برشلونة). (Al-Esawee و AL-Taae ، 2016)

جـــدول(14) النســـبة المئويـــة للتثبـــيط لعـــزلات الفطـــر *Trichoderma* spp. ضـــد الفطرالممرض *Sclerotinia* sp. .

النسبة المئوية للتثبيط لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطرالممرض *Sclerotinia* sp.								
العزلة الفطرية *Trichoderma spp*	النسبة % للتثبيط	ت	العزلة الفطرية *Trichoderma spp*	النسبة % للتثبيط	ت	العزلة الفطرية *Trichoderma spp*	النسبة % للتثبيط	ت
T.B1	70.33	19	T.K3	22.22	37	T.D10	64.81	1
T.B6	33.33	20	T.K11	53.69	38	T.N2	55.55	2
T.B10	72.21	21	T.K10	74.07	39	T.N3	79.62	3
T.B4	81.47	22	T.H2	57.40	40	T.N4	81.47	4
T.M1	40.73	23	T.H3	68.69	41	T.N9	83.32	5
T.M2	88.88	24	T.H4	49.99	42	T.N10	55.55	6
T.M4	22.22	25	T.H5	48.14	43	T.N11	79.62	7
T.M8	77.77	26	T.H6	64.81	44	T.T2	20.36	8
T.S2	68.69	27	T.H7	88.88	45	T.T3	53.7	9
T.S3	22.22	28	T.H8	83.32	46	T.T7	49.99	10
T.S4	33.33	29	T.H9	64.81	47	T.E1	72.21	11
T.S5	70.36	30	T.D2	48.14	48	T.E2	49.99	12
T.S6	20.36	31	T.D3	72.21	49	T.E8	53.7	13
T.S7	72.21	32	T.D4	83.32	50	T.R2	55.55	14
T.S8	57.40	33	T.D5	53.7	51	T.R3	53.7	15
T.S10	72.21	34	T.D7	64.81	52	T.R8	62.95	16
T.K4	44.44	35	T.D8	74.25	53	T.R10	70.36	17
T.K8	87.03	36	T.D9	79.62		------	----	18
L.S.D 0.05			6.093					

*** كل رقم يمثل معدل ثلاثة مكررات**

4-3-2: اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد العزلات الفطرية الممرضة تحت ظروف البيت البلاستيكي في الاصص البلاستيكية .

أظهرت نتائج جدول (15 ، 16 ،17) (شكل 3) القدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد العزلات الفطرية الممرضة في الاصص البلاسيكية وجود فرق معنوي بين الفطر المقاوم والفطر الممرض حيث أعطت اعلى نسبة انبات لبذور للخيار 66.33 % كانت للعينات T.K8, T.B10, T.B4 T.H7, واقل نسبة انبات كانت للعينة T.N4, T.N9 T.K8, T.H8, T.R10 T.M2, وبنسبة 56.66 % وكانت اعلى نسبة المئوية لموت البادرات 35.71 للعينات T.N9,T.R10,T.D7, واقل نسبة 25.00 للعينات

T.N4,T.B4,T.D9,T.M2 ضد الفطر الممرض *Fusarium* sp. وكانت القدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد *الفطر الممرض* *Pythium* sp. اذ كانت اعلى نسبة انبات لبذور الخيار للعينات T.D7,T.N4,T.H7,T.B10,T.B4 بلغت 66.33% واقل نسبة انبات للبادرات 56.66 % للعزلات الفطرية T.H8,T.N9,T.M2,T.R10 وتراوحت النسبة المئوية لموت البادرات (25.00 _ 35.71%) للعزلات T.B4 ، T.N9 على التوالي . واظهرت اعلى نسبة انبات لبذور للخيار 66.33 % كانت للعينة T.B10,T.N4,T.H7,T.D7 T.B4, واقل نسبة انبات كانت للعينة T.H8,T.M2,T.K8,T.R10 وبنسبة 56.66 % وكانت اعلى نسبة المئوية لموت البادرات 35.71 % للعينة T.D9 واقل نسبة 25.00 للعينة T.R10,T.N4,T.D9,T.B4 ضد الفطر الممرض *Rhizoctonia* sp. .

ابدى المقاوم الحيوي كفاءة عالية في قدرته التضادية ضد عزلة الفطر الممرض ، حيث تفوق معنويا على معاملة المقارنة والتي لم يستخدم فيها المقاوم الحيوي وبلغ معدل انبات الممرض *Fusarium* sp. مع المقاوم الحيوي 66.33% للعزلات T.K8, T.B10, T.B4 ,T.H7 وبنسبة تثبيط بلغت 28.62% (جدول 15) ، وقد تعود القدرة التضادية للمقاوم الحيوي *Trichoderma* spp. إلى الاستعمار السطحي لهايفات المقاوم الحيوي أو عن طريق اخترقه المباشر لهايفات الفطر الممرض ، كما أنه قد تعود القدرة التضادية لهذا المقاوم الحيوي إلى افراز واحد أو اكثر من المضادات الحياتية مثل Trichodermin و Emodine و Gliotoxins وPachybascine والتي تعمل على تثبيط نمو الفطريات الممرضة (سعيد،2015) .

جدول (15) المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد عزلة الفطر الممرض *Fusarium* sp. في الاصص البلاستيكية .

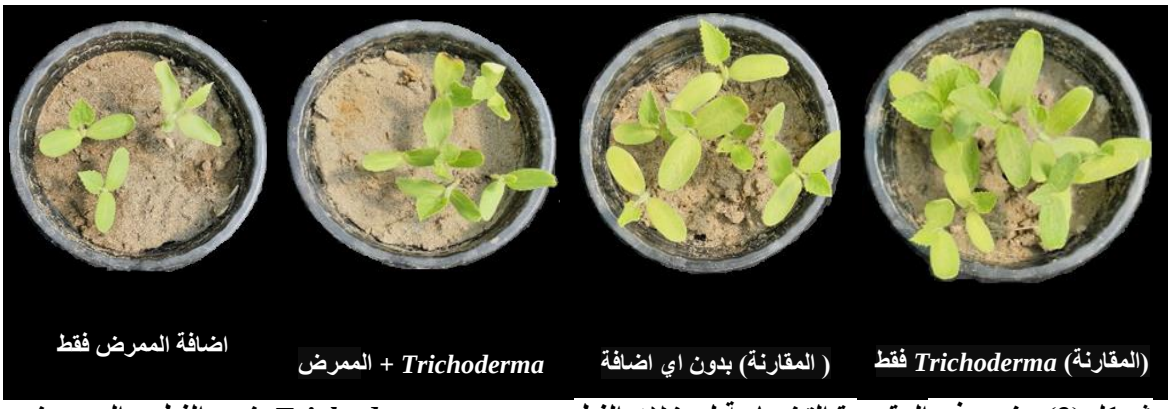
المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد عزلة الفطر الممرض *Fusarium sp.*					
ت	المعاملات	النسبة % للانبات	النسبة % للتثبيط	النسبة % لموت البادرات	النسبة % للتثبيط
1	بدون أي اضافة	93.33	0.00	0.00	0.00
2	الممرض فقط	30.00	0.00	93.33	0.00
3	T.B4 فقط	96.66	0.00	0.00	100
4	الممرض + T.B4	66.33	28.92	25.00	73.21
5	T.B10 فقط	83.33	10.71	0.00	100
6	الممرض + T.B10	66.33	28.92	32.14	65.56
7	T.D7 فقط	96.66	0.00	0.00	100
8	الممرض + T.D7	66.33	28.92	35.71	61.73
9	T.D9 فقط	93.33	0.00	0.00	100
10	الممرض + T.D9	60.00	39.59	25.00	73.21
11	T.H7 فقط	96.66	0.00	0.00	100
12	الممرض + T.H7	66.33	28.92	28.57	69.38
13	T.H8 فقط	93.33	0.00	0.00	100
14	الممرض + T.H8	56.66	42.95	28.57	69.38
15	T.K8 فقط	93.33	0.00	0.00	100
16	الممرض + T.K8	56.66	42.95	28.57	69.38
17	T.N4 فقط	96.66	0.00	0.00	100
18	الممرض + T.N4	56.66	42.95	25.00	73.21
19	T.N9 فقط	93.33	0.00	0.00	100
20	الممرض + T.N9	56.66	42.95	35.71	61.73
21	T.M2 فقط	96.66	0.00	0.00	100
22	الممرض + T.M2	56.66	42.95	25.00	73.21
23	T.R10 فقط	93.33	0.00	0.00	100
24	الممرض + T.R10	56.66	42.95	35.71	61.73
	L.S.D 0.05	7.504	------	17.43	-----

جدول (16) المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد عزلة الفطر الممرض *Pythium* sp. في الاصص البلاستيكية.

المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد عزلة الفطر الممرض *Pythium* sp.					
ت	المعاملات	النسبة % للانبات	النسبة % للتثبيط	النسبة % لموت البادرات	النسبة % للتثبيط
1	بدون أي اضافة	93.33	0.00	0.00	0.00
2	الممرض فقط	35.00	0.00	93.33	0.00
3	T.B4 فقط	96.66	0.00	0.00	100
4	الممرض + T.B4	66.33	28.92	25.00	73.21
5	T.B10 فقط	93.33	0.00	0.00	100
6	الممرض + T.B10	66.33	28.92	32.14	65.56
7	T.D7 فقط	96.66	0.00	0.00	100
8	الممرض + T.D7	66.33	28.92	35.71	61.73
9	T.D9 فقط	93.33	0.00	0.00	100
10	الممرض + T.D9	60.00	39.59	25.00	73.21
11	T.H7 فقط	96.66	0.00	0.00	100
12	الممرض + T.H7	66.33	28.92	32.14	65.56
13	T.H8 فقط	93.33	0.00	0.00	100
14	الممرض + T.H8	56.66	42.95	28.57	69.38
15	T.K8 فقط	93.33	0.00	0.00	100
16	الممرض + T.K8	60.00	39.59	25.00	73.21
17	T.N4 فقط	96.66	0.00	0.00	100
18	الممرض + T.N4	66.33	28.92	32.14	65.56
19	T.N9 فقط	93.33	0.00	0.00	100
20	الممرض + T.N9	56.66	42.95	35.71	61.73
21	T.M2 فقط	96.66	0.00	0.00	100
22	الممرض + T.M2	56.66	42.95	25.00	73.21
23	T.R10 فقط	93.33	0.00	0.00	100
24	الممرض + T.R10	56.66	42.95	35.71	61.73
L.S.D 0.05		7.707	-------	17.72	-------

جـدول (17) المقـدرة التضـادية لعـزلات الفطـر *Trichoderma* spp. ضـد عزلـة الفطـر الممرض *Rhizoctonia* sp. في الاصص البلاستيكية .

المقـدرة التضـادية لعـزلات الفطـر *Trichoderma* spp. ضـد عزلـة الفطـر الممـرض *Rhizoctonia* sp.					
ت	المعاملات	% للانبات	% للتثبيط	% لمـــــــوت البادرات	% للتثبيط
1	بدون أي اضافة	93.33	0.00	0.00	0.00
2	الممرض فقط	30.00	0.00	93.33	0.00
3	T.B4 فقط	96.66	0.00	0.00	100
4	الممرض + T.B4	66.33	28.92	25.00	73.21
5	T.B10 فقط	96.66	0.00	0.00	100
6	الممرض + T.B10	66.33	28.92	32.14	65.56
7	T.D7 فقط	96.66	0.00	0.00	100
8	الممرض + T.D7	66.33	28.92	35.71	61.73
9	T.D9 فقط	93.33	0.00	0.00	100
10	الممرض + T.D9	60.00	39.59	25.00	73.21
11	T.H7 فقط	96.66	0.00	0.00	100
12	الممرض + T.H7	66.33	28.92	28.57	69.38
13	T.H8 فقط	93.33	0.00	0.00	100
14	الممرض + T.H8	56.66	42.95	28.57	69.38
15	T.K8 فقط	93.33	0.00	0.00	100
16	الممرض + T.K8	56.66	42.95	28.57	69.38
17	T.N4 فقط	93.33	0.00	0.00	100
18	الممرض + T.N4	60.00	39.59	25.00	73.21
19	T.N9 فقط	96.66	0.00	0.00	100
20	الممرض + T.N9	66.33	28.92	28.57	69.38
21	T.M2 فقط	93.33	0.00	0.00	100
22	الممرض + T.M2	56.66	42.95	28.57	69.38
23	T.R10 فقط	93.33	0.00	0.00	100
24	الممرض + T.R10	56.66	42.95	35.71	61.73
L.S.D 0.05		76.87	-------	17.28	-----



شكل (3) : نموذج المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *Fusarium* sp. حقلياً في الاصص البلاستيكية و المقارنة *Trichoderma* sp. فقط .

وهذه النتائج قد اتفقت مع دراسات سابقة فقد أظهر كل من الفطر الأحيائي *Trichoderma* spp. والبكتريا *Bacillus* spp. كفاءة عالية في خفض نسبة وشدة الأصابة بالفطر الممرض وتحت الظروف الحقلية وبصورة مفردة مما شجع على أدخال هذه العوامل مجتمعة في برامج المكافحة لحماية نبات الذرة الصفراء من مرض تعفن الحبوب والعرانيص (الجبوري واخرون ،2018) .اثبت في دراسات سابقة أن لاستخدام بعض أنواع الفطر *Trichoderma* spp. مثل *T. viride* و *T. harzianum* دوراً فعالاً في مقاومة الفطرين *R.solani* و*M.phaseolina* وحماية بذور الباميا عند استخدامهما بشكل مفرد و ازداد مثل ذلك التأثير بشكل معنوي عند معاملة البذور بهذين الفطرين بشكل متداخل *T. viride* و *T. harzianum* , كما ادى ذلك إلى حصول زيادة واضحة في مستوى بعض الأنزيمات مثل Oxidaes Polyphenol ، Peroxidase ذات التأثير الضار المسببات المرضية (Howell و آخرون, 2000 و اللشي ,2013). في حين درس كل من عبيد والجنابي (2013) إمكانية تحفيز مقاومة نباتات الخيار ضد الإصابة بفطر البياض الدقيقي بواسطة فطر المكافحة الحيوية *T. harzianum* وقد تبيّن أن سقي النباتات براشح فطر المكافحة الحيوية أدى الى خفض تجرثم الفطر *P. xanthii* على أوراق الخيار الى حوالي 53 % مقارنة مع معاملة السيطرة ، تم اختبار التأثيرات المضادة لعزلات *Trichoderma* ضد ثلاثة أنواع من الفطريات الممرضة *Sclerotinia* spp. ، *F.oxysporum* ، *F. solani* فقد اظهرت النتائج المقدمة في هذه الدراسة دعم لمفهوم المكافحة البيولوجية وتعزيز نمو النبات بواسطة *Trichoderma* spp. كاستراتيجية بديلة لاستحثاث المكافحة (Paudel واخرون ، 2017) كذلك تتفق هذه النتيجة مع ما وجدة العديد من الباحثين الذين أشاروا الى القدرة التثبيطية العالية للفطر

Trichoderma spp. ضد الفطريات الممرضة ومنها الفطر *Fusarium* spp. (Khalilia وأخرون،2016) وربما تعود قدرته واستعماله كعامل مكافحة أحيائية الى عدة أسباب منها قدرته على التطفل المباشر على الغزل الفطري للفطر الممرض عن طريق الألتفاف حول خيوطة او من خلال منافسته على الغذاء والمكان وقدرته على انتاج انزيمات محللة وسموم ومضادات حيوية مثل Chitinase وProtease وغيرها او ربما تعزى قدرته الى انتاج مركبات طيارة (Gajera وأخرون،2012).

4-4: دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. في استحثاث المكافحة الجهازية في نبات الخيار ضد الفطريين الممرضين *Fusarium* sp. و *Rhizoctonia* sp.

بينت النتائج ان جميع عزلات الفطر *Trichoderma* spp. لها تأثير معنوي في استحثاث المكافحة الجهازية في النباتات ضد عزلات الفطريات الممرضة *Rhizoctonia* spp. ، *Fusarium* spp. ، قياسا بمعاملة المقارنة (الفطر الممرض بمفردة). اذ اظهرت عزلة الفطر T. B4. كفاءة عالية في استحثاث المكافحة الجهازية في النبات (جدول 18) اذ بلغت اعلى فعالية لانزيم البيروكسيديز وحدة / غم وزن طري 1.47 للعزلة T.B4مع الممرض واعلى فعالية لانزيم بولي فينول اوكسيديز 2.65 وحدة / غم وزن طري للعزلة T.H7 مع الممرض ، واعلى قيمة للفينولات الكلية 0.82 ملغم /غم وزن طري للعزلة T.B4 ضد الممرض *Fusarium* spp.، اما ضد الممرض *Rhizoctonia* spp. جدول (19) فقد بلغت اعلى فعالية لانزيم البيروكسيديز وحدة / غم وزن طري 1.48 للعزلة T.H8مع الممرض واعلى فعالية لانزيم بولي فينول اوكسيديز 2.65 وحدة / غم وزن طري للعزلة T.H7 مع الممرض ، واعلى قيمة للفينولات الكلية 0.82 ملغم /غم وزن طري للعزلة T.B4 ضد الممرض .

اذ بينت الدراسات السابقة ان استخدام الفطر *T. harzianum* في تعزيز نمو النبات نتيجة افراز مضادات حياتية تعمل على استحثاث المقاومة ضد المسببات المرضية وتقليل التنافس مع الاحياء المجهرية على الغذاء وكذلك نتيجة التأثير الإيجابي للفطر عن طريق توفير حماية للجذور بتكوين مستعمرات حول الجذر ويعمل على زيادة حجم المجموع الجذري وصلابة الجذور فضلا عن حماية الجذور من المسببات المرضية بالاضافة الى ظهور مقاومة جهازية من خلال مسارات تأشير حمض الياسمونيك / الإيثيلين وحمض الساليسيليك (Vitti واخرون 2016) .

جدول (18) دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. في استحثاث المكافحةالجهازية في النبات ضد الفطر الممرض *Fusarium* sp.

دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. في استحثاث المكافحة الجهازية في النبات ضد الفطر الممرض *Fusarium* sp.				
ت	المعاملات	البولي فينول اوكسديز PPO	البيروكسيديز POD	الفينولات ملغم / غم وزن طري
1	بدون أي اضافة	0.28	1.005	0.27
2	الممرض فقط	0.85	0.96	0.20
3	T.B4 فقط	1.57	1.52	0.37
4	الممرض + T.B4	2.03	1.47	0.82
5	T.B10 فقط	1.47	1.40	0.24
6	الممرض + T.B10	2.12	1.33	0.46
7	T.D7 فقط	1.37	1.12	0.27
8	الممرض + T.D7	2.02	1.37	0.20
9	T.D9 فقط	1.44	1.32	0.37
10	الممرض + T.D9	2.08	1.37	0.24
11	T.H7 فقط	1.34	1.14	0.42
12	الممرض + T.H7	2.65	1.42	0.77
13	T.H8 فقط	1.24	1.14	0.24
14	الممرض + T.H8	2.25	1.42	0.46
15	T.K8 فقط	1.44	1.32	0.27
16	الممرض + T.K8	2.08	1.37	0.20
17	T.N4 فقط	1.57	1.14	0.76
18	الممرض + T.N4	2.03	1.42	0.24
19	T.N9 فقط	1.47	1.40	0.42
20	الممرض + T.N9	2.12	1.33	0.56
21	T.M2 فقط	1.37	1.12	0.24
22	الممرض + T.M2	2.02	1.37	0.78
23	T.R10 فقط	1.57	1.32	0.27
24	الممرض + T.R15	2.03	1.37	0.20
L.S.D. ….(0.05)		1.683	1.297	0.386

وفي دراسات اخرى ولأهمية محصول الحنطة والخسائرالتي يتعرض لها بسبب مرض تعفن الجذورالمتسبب عن الفطر *R.solani* فقد أجريت تقيم كفاءة استحثاث العامل الاحيائي *T.harzianum* والعامل الكيميائي حامض الساليسيليك في المقاومة باستخدام آليات استحثاث

المكافحة الجهازية وتقيم كفاءة الاستحثاث في مؤشرات النمو الخضرية والإنتاجية لعدد من أصناف الحنطة العراقية (حسن و القيسي ،2019).

جدول (19) دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. في استحثاث المكافحةالجهازية في النبات ضد الفطر الممرض *Rhizoctonia* sp.

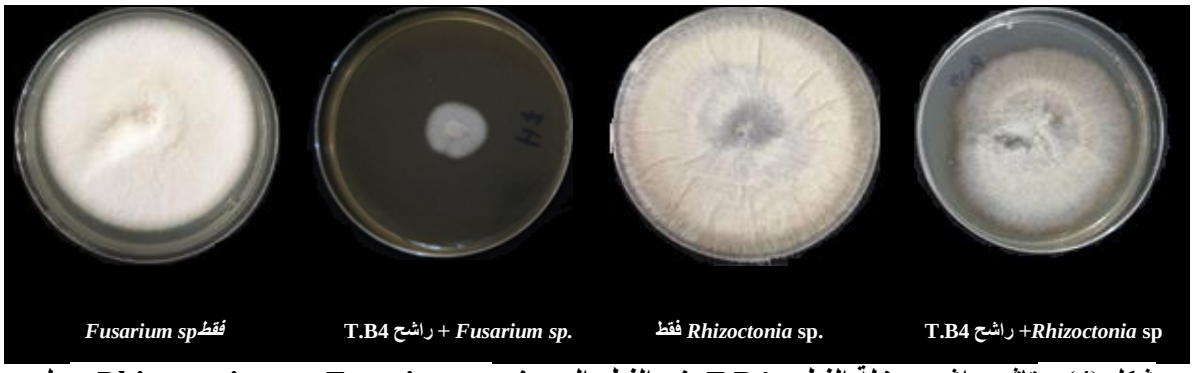
دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. في استحثاث المكافحةالجهازية في النبات ضد الفطر الممرض *Rhizoctonia* sp.				
ت	المعاملات	البولي فينول اوكسديز PPO	البيروكسيديز POD	الفينولات ملغم / غم وزن طري
1	بدون أي اضافة	0.28	1.005	0.27
2	الممرض فقط	0.85	0.96	0.20
3	T.B4 فقط	1.57	1.52	0.37
4	الممرض + T.B4	2.08	1.47	0.82
5	T.B10 فقط	1.47	1.46	0.44
6	الممرض + T.B10	2.12	1.43	0.44
7	T.D7 فقط	1.37	1.02	0.29
8	الممرض + T.D7	2.02	1.37	0.30
9	T.D9 فقط	1.34	1.32	0.47
10	الممرض + T.D9	2.08	1.37	0.44
11	T.H7 فقط	1.34	1.18	0.42
12	الممرض + T.H7	2.65	1.42	0.78
13	T.H8 فقط	1.28	1.24	0.54
14	الممرض + T.H8	2.25	1.48	0.49
15	T.K8 فقط	1.44	1.32	0.37
16	الممرض + T.K8	2.08	1.47	0.30
17	T.N4 فقط	1.57	1.24	0.78
18	الممرض + T.N4	2.03	1.42	0.24
19	T.N9 فقط	1.47	1.40	0.42
20	الممرض + T.N9	2.12	1.33	0.66
21	T.M2 فقط	1.47	1.32	0.44
22	الممرض + T.M2	2.02	1.32	0.78
23	T.R10 فقط	1.57	1.38	0.57
24	الممرض + T.R15	2.03	1.47	0.46
L.S.D. ….(0.05)		1.687	1.329	0.470

كما ذكر Kilonzi و اخرون (2020) ان للفطر *T. asperellum* كفاءة عالية في السيطرة على مرض اللفحة المتاخرة على الطماطة المتسببة عن الفطر *P. infestans* من خلال تحفيزة للمقاومة الجهازية في النبات و زيادة محتواه في الفينولات و حامض السالسليك و تحفيز فعل الانزيمات مثل Peroxidase و Oxidase و Lipoxygenase (Mohamed و اخرون، 2020) و(الاسدي ، 2020) ينتج الفطر *Trichoderma* spp. بعض البيتيدات و البروتينات و االانزيمات كانزيم Peroxidase و كذلك بعض المركبات الواطئة الوزن الجزيئي التي تسهم في تحفيز الآليات الدفاعية في النباتات مما ينتج عنها زيادة في انتاج بعض المركبات الفينولية و الكحولية ذات التاثير التثبيطي للمسببات المرضية (Reino و اخرون، 2007 و Bisen و اخرون، 2016).

كذلك اثبت Ruocco و اخرون (2009) ان استعمار فطر المقاومة.*Trichoderma* spp لجذور بادرات بعض النباتات في مراحل نموها المبكرة ادى الى انتاج مركبات مضادة للمسببات المرضية و منها انتاج الانزيم Peroxidase.

4- 5 : تاثير راشح عزلات الفطر *Trichoderma* spp. في النمو القطري لعزلات الفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA مختبريا

برهنت النتائج ان لرواشح عزلات الفطر .*Trichoderma* spp (11) تاثيرات متباينة في تثبيط نمو الفطريات الممرضة .*Fusarium* sp ، .*Rhizoctonia* sp ، .*Pythium* sp, .*Sclerotinia* sp جدول (20) شكل (4) ، اذ اظهرت كفاءة تضادية عالية، اذ بلغت نسبة تثبيط لها 71.92 – 21.51 % قياسا بمعاملة السيطرة 0.00 % ، و تراوحت نسبة التثبيط القطري للفطر .*Fusarium* sp. بين 87.55 % _ 22.22 % وكانت نسبة التثبيط القطري للفطر .*Rhizoctonia* sp. بين 81.55 % _ 36.66 % *وبلغت* نسبة التثبيط القطري للفطر *Pythium* sp. بين (84.33 %_ 25.00 %) وكانت اعلى نسبة للتثبيط القطري للفطر .*Sclerotinia* sp 87.55 % واقل نسبة تثبيط قطري 24.33 % ، وكان اعلى معدل للنمو القطري 78.49 % بينما كان اقل معدل للنمو القطري 63.18 % أن إنخفاض نسب نمو الفطر الممرض تحت تأثير العزلات الفطرية التابعة للفطر .*Trichoderma* spp قد يعود إلى طبيعة المواد المنتجة و منها الأنزيمات المحللة و السم الفطري Gliotoxin الذي يؤثر على نمو الفطريات الممرضة .



شكل (4) : تاثير راشح عزلة الفطر *T.B4.* ضد الفطر الممرض *Fusarium sp.* ، *Rhizoctonia sp.* على وسط PDA والمقارنة (الفطر الممرض لوحدة).

جدول (20) تاثير راشح عزلات الفطر *Trichoderma sp.* في تثبيط النمو القطري لعزلات الفطريات الممرضة

ت	المعاملات	*Fusarium sp.*	*Rhizoctonia sp.*	*Pythium sp.*	*Sclerotinia sp.*	معدل % للنمو	معدل % للتثبيط
1	الممرض بدون أي اضافة	%100	%100	%100	%100	%100	%0.00
2	الممرض + راشح T.B4	22.22	38.88	33.88	32.22	31.80	68.20
3	الممرض + راشح T.B10	75.00	77.77	76.00	65.00	73.44	26.56
4	الممرض + راشح T.D7	55.55	63.88	77.77	55.55	63.18	36.82
5	الممرض + راشح T.D9	35.22	50.00	31.88	25.22	28.08	71.92
6	الممرض + راشح T.H7	37.77	47.55	37.66	27.77	37.68	62.32
7	الممرض + راشح T.H8	82.22	81.55	54.22	82.22	75.05	24.95
8	الممرض+ راشح T.K8	87.55	75.00	63.88	87.55	78.49	21.51
9	الممرض + راشح T.N4	44.33	36.66	25.00	24.33	32.58	67.42
10	الممرض + راشح T.N9	80.00	59.33	84.33	80.00	75.91	24.09
11	الممرض + راشح T.M2	30.77	45.22	38.77	32.77	36.88	63.12
12	الممرض + راشح T.R10	72.22	48.66	72.22	72.22	60.33	39.67
	L.S.D. ….(0.05)	56.62	5.677	5.141	5.316	-----	----

تتفق نتائج هذه التجارب مع دراسات سابقة . فقد أثبتت كثير من الدراسات أن الفطريات, *T.viride* و *T.harzianum* و *T.ressei* لها القدرة على انتاج إنزيمات في رواشحها مثل Exoglucanases و Endoglucanases و Cellulases و Cellobiases التي تحول السليلوز إلى كلوكوز (Szengyel وآخرون ، 2000) ولنجاح العامل الحيوي بهذا الاتجاه لابد أن يمتلك مثل هذه القدرة لكي يحلل جدار خلايا المسبب المرضي (Carsolio وآخرون ، 1999) . كذلك تعزى قدرة أنواع الفطر *Trichoderma* في اختزال النمو الفطري لعددٍ من الفطريات الممرضة مثل *F.oxysporum* و *F.culmorum* و*F.moniliforme* و*R.solani* فضلاً عن المضادات الحيوية فأنها تقوم بأنتاج الإنزيمات المحللة Proteolytic Enzymes مثل Chitinase و Cellulase و Protease و β-1,3-gluconase (Kuguk و Kivang، 2002) .

بينما اكد Dwivedi و Prasad (2016) بأن مركبات الايض الثانوي تعمل كمضادات حيوية ضد الفطريات المنتجة من قبل الفطريات *T.harzianum, T. viride* ،*Gliocladium virens* التي تمنع امراض تعفن الجذور وتعفن الساق والذبول وغيرها من الأمراض التي تسببها *Sclerotium rolfsii* و*Macrophomina phaseolina* و*Rhizoctonia solani* و *Fusarium sp* و *Pythium debarianum* و قد تبين أن المركبات المنتجة من الفطرين *T.harzianum* و *T.hamatum* كانا أكثر فاعلية ضد *Sclerotium rolfsii* ومثبطان نمو الفطريات بنسبة 79٪ لأنها تنتج مركبات من المضادات الحيوية مثل Viridin و gliotoxin و glioviridin و dermin و trichodermin .

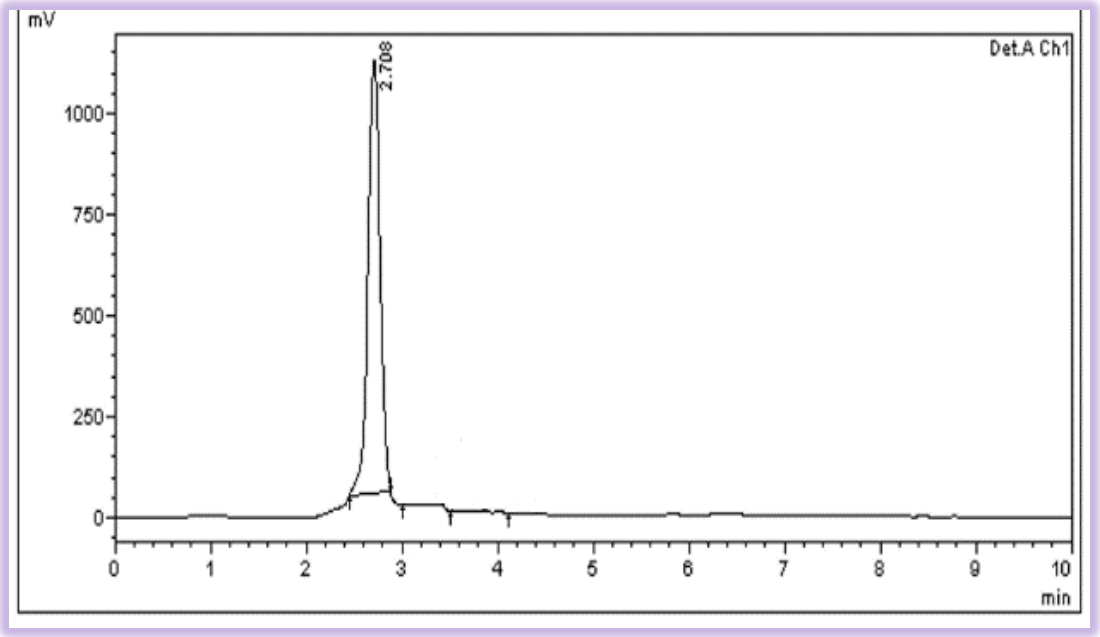
6-4 : التقدير الكمي والنوعي لسم Gliotoxin باستخدام تقانة كروموتوكرافيا السائل فايق الأداء High Performance Liquid Chromatography (HPLC) لمستخلص عزلات الفطر *Trichoderma* sp.

تم الكشف عن سم Gliotoxin بجهاز HPLC لغرض تحديد تركيز Gliotoxin المنتج من العينة أظهرت النتائج عند ظروف التجربة وجود السم في خمس عزلات من الفطر من اصل 11 عزلة فطرية وان اعلى تركيز كان للعزلة T.N4 بمعدل 132.8 (مكغم \غم) تلاه العزلة T.M2 بمعدل (مكغم \غم) 124.97 وان اقل تركيز كان للعزلة T.D9 وبمعدل 76.92 (مكغم \غم) . جدول (21) شكل (5) .

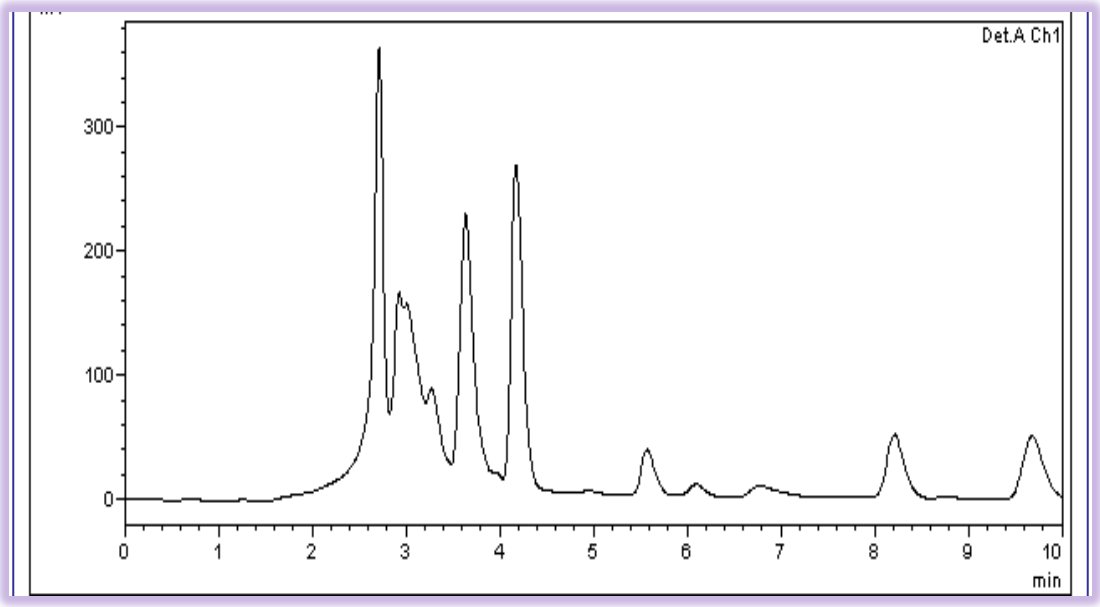
ينتج gliotoxin عن عدة أنواع من *Trichoderma* spp. مثل *T. virens* و *T. lignorum* و *T. viride* (Scharf واخرون ، 2016 و Silva، 2019) فقد اشار Chohan وآخرون 2019 بان العديد من انواع الفطر *Trichoderma* spp. لها القابلية على انتاج السموم الفطرية التي لها القابلية على تثبيط المسببات المرضية والتي من اهمها *T. harzianum* و *T. viride* يمكن أنْ تستعمر في منطقة الرايزوسفيرا وإنتاج السموم الفطرية (المضادات الحيوية) مثل viridin وgliotoxin وإنزيمات تحلل جدار الخلية .

جدول(21) التقدير الكمي والنوعي لسم Gliotoxin لعزلات الفطر*Trichoderma spp*.

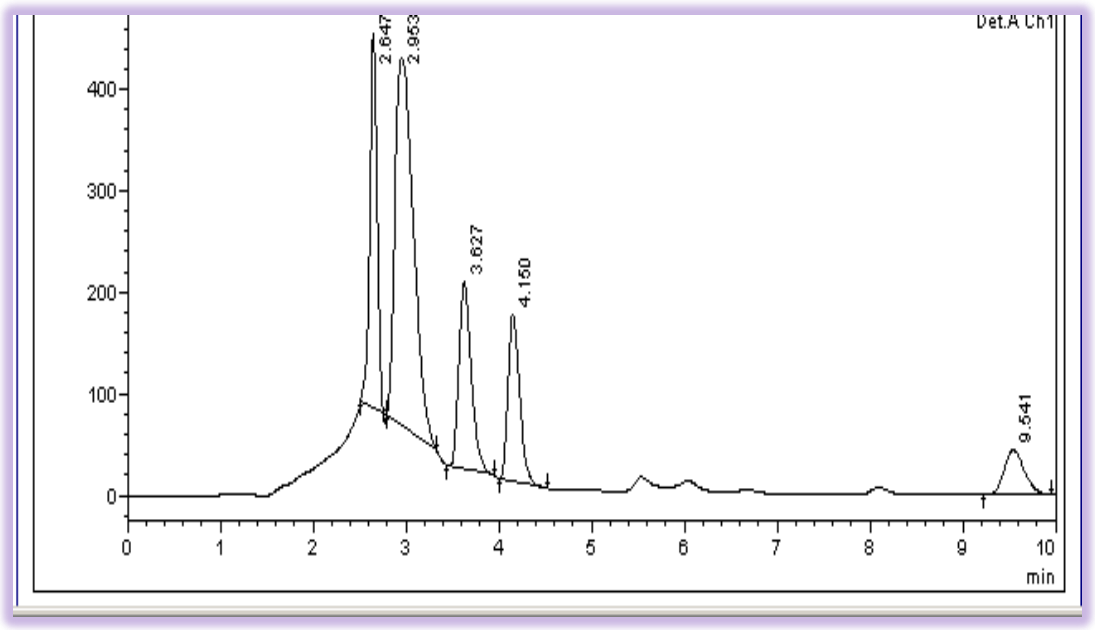
ت	العزلات الفطرية	مكان جمع العينة	اسم المركب	التقدير الكمي ميكروغرام / غم
1	العزلة T.B4	بغداد \ البياع	Gliotoxin	100.73
2	العزلة T.B10	بغداد \ مستنصرية	------	-------
3	العزلة T.D7	ديوانية \ شامية	------	-------
4	العزلة T.D9	ديوانية \ اطراف	Gliotoxin	76.92
5	العزلة T.H7	بابل \ السدة	Gliotoxin	89.14
6	العزلة T.H8	بابل \ الكفل	-------	-------
7	العزلة T.K8	كربلاء \ الحر	-------	-------
8	العزلة T.N4	نجف \ عباسية	Gliotoxin	132.8
9	العزلة T.N9	نجف \ مفرك الكفل	-------	-------
10	العزلة T.M2	موصل \ الشورة	Gliotoxin	124.97
11	العزلة T.R10	كركوك\ تازة خورماتو	-------	-------



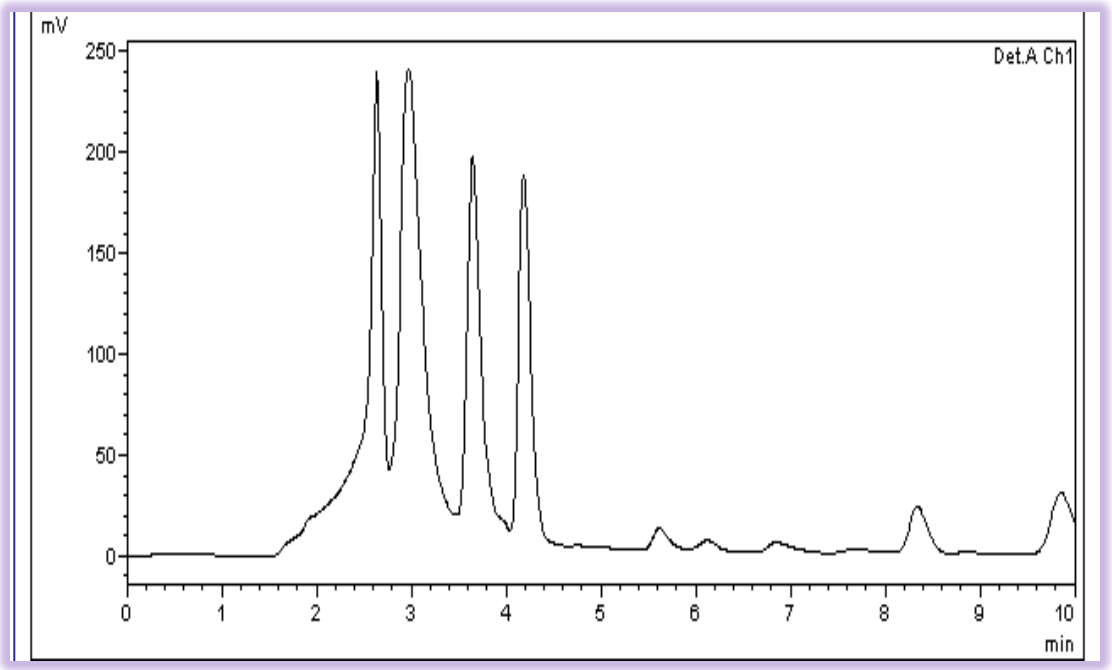
شكل (5 -أ) السم القياسي للـGliotoxin



شكل (5 - ب) التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Gliotoxin لراشح العزلة الفطري T.M2



شكل (5 – جـ) التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Gliotoxin لراشح العزلة الفطري T.N4



شكل (5- د) التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Gliotoxin لراشح العزلة الفطري T.H7

4-7: التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية التابعة للفطر *Trichoderma* spp. المنتخبة .

اكدت نتائج تحليل التتابع النيوكليوتيدي لـ11 عزلةً من الفطر *Trichoderma* spp. التي تم عزلها من تربة النباتات السليمة ، تشخيصها تحت عدة انواع متباينة ، وكانت اغلب العزلات تعود الى النوع *Trichoderma reesei* . فقد اظهرت نتائج تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلات بانها تعود للفطريات *Trichoderma viride* و *Trichoderma reesei* و *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma koningii* و *Trichoderma pseudokoningii* و *Trichoderma koningiopsis* كما في الجدول (22)

اذ تم تسجيل جميع العزلات في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوي (NCBI) وتحت الرموز البنكية المبينة ازاء كل منها في الجدول المذكور وحققت التسلسلات النيوكليوتيدية الجزيئية اعلى نسبة تطابق تراوحت مابين 99.07 – 100 % ، عند مقارنتها مع التسلسلات النيوكليوتيدية المكافئة المسترجعة من بنك الجينات في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) بأستخدام برنامج الـ BLAST ولكل عزلة فطرية بشكل منفرد كما أُجريت التحاليل النيوكليوتيدية باستعمال برنامج MEGA لتحليل العزلات ورسم شجرة القرابة بين كل من هذه العزلات والعزلات المشابهة لها المسجلة بمركز NCBI ضمن شجرة الاصـــــــول الوراثية (phylogenetic tree) من النوع الضام بالتجاور(Neighbor joining) التي تم بناؤها من التسلسل الجزيئي النيوكليوتيدي لمنطقة SSU العائدة لكل من العزلات .

كان للتعرف على المنطقة الجينية ITS (Intragenic transcriptional sp.acer) والمنطقة الجينية Small subunit (SSU) أهمية كبيرة في اكتشاف طريقة دقيقة في تشخيص الفطريات على مستوى الأنواع أو السلالات التابعة لنوع أو أنواع مختلفة و كذلك دورها في فهم العلاقة الوراثية (Phylogeny) بين تلك الأنواع أو السلالات (Conrad وآخرون ، 2012). كما أسهمت الاختلافات المتواجدة في المنطقة الجينية (ITS) و(SSU) في الكائنات الحية الحقيقية النواة ، ولعبت دوراً مهماً و دقيقاً في تشخيص تلك الكائنات و منها الفطريات مثل *F. proliferatum* و *Trichoderma* spp *Rh.solani* و *Cladosporium* spp. و *F. verticillioides* (AL-Fadhal وأخرون، وDewan , 2018 و آخرون، 2019 وAl-Sharmani و آخرون، 2019).

جدول (22) : التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. باستخدام تحليل التتابع النيوكليوتيدي و GenBank Accession Number و Submission Number لها .

ت	رمز العزلة	نوع العزلة الفطرية	اسم التسجيل في NCBI	رقم الايداع في NCBI
1	YShB4	*Trichoderma viride*	Trichoderma viride .Y.N.135.Shahad	MZ970839
2	YShB10	*Trichoderma reesei*	Trichoderma reesei .Y.N.136.Shahad	MZ970838
3	YShD7	*Trichoderma harzianum*	Trichoderma harzianum .Y.N.137.Shahad	MZ970767
4	YShD9	*Trichoderma koningii*	Trichoderma koningii. Y.N.138.Shahad	MZ851984
5	YShH7	*Trichoderma pseudokoningii*	Trichoderma pseudokoningii.Y.N.139.Shahad	MZ970709
6	YShH8	*Trichoderma pseudokoningii*	Trichoderma pseudokoningii.Y.N.140.Shahad	MZ927764
7	YShK8	*Trichoderma reesei*	Trichoderma reesei .Y.N.141.Shahad	MZ970710
8	YShM2	*Trichoderma koningiopsis*	Trichoderma koningiopsis. Y.N.142.Shahad	MZ994499
9	YShN4	*Trichoderma harzianum*	Trichoderma harzianum .Y.N.143.Shahad	MZ853739
10	YShN9	*Trichoderma reesei*	Trichoderma reesei .Y.N.144.Shahad	MZ970711
11	YShR15	*Trichoderma reesei*	Trichoderma reesei .Y.N.145.Shahad	OK078029

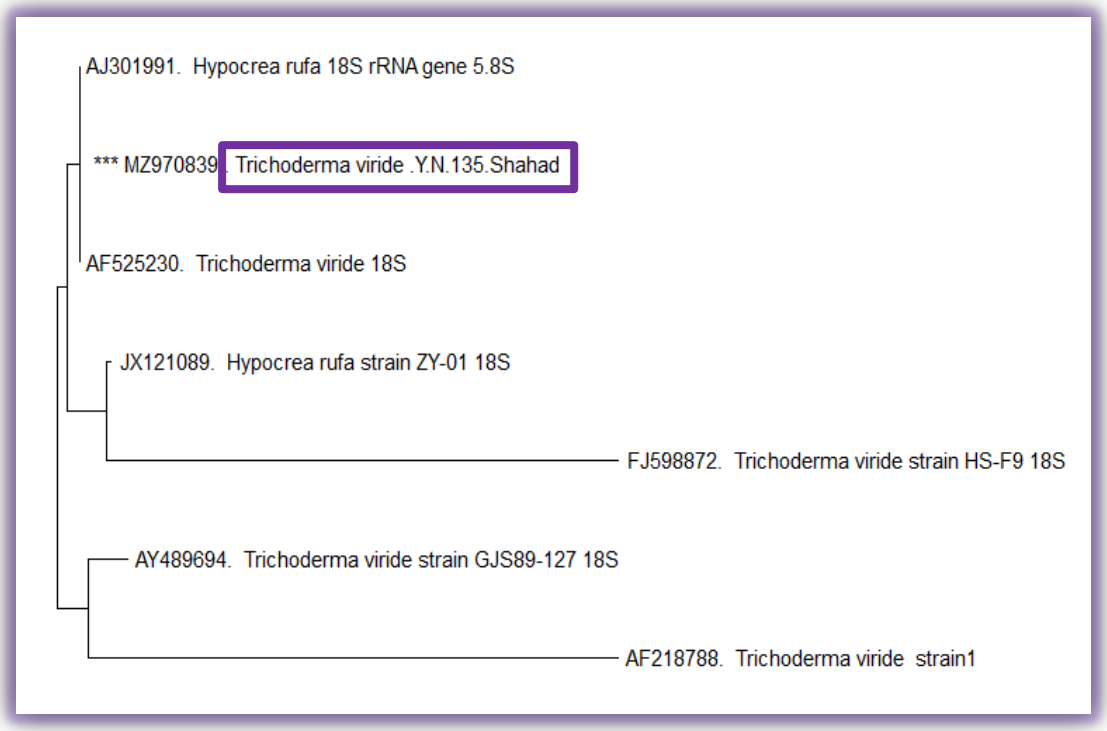
4- 1-7 : تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة *Trichoderma viride* Y.N.135.Shahad ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالمياً في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) نفسه.

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر *Trichoderma viride* Y.N.135.Shahad المعزول من ترب النباتات السليمة مع البيانات

المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (99.82%) مع العزلة الصينية (AF525230) والعزلة الألمانية (AJ301991) , وبلغت نسبة التشابه الوراثي (99.70%) مع العزلة الصينية (JX121089) والعزلة الأمريكية (AY489694) و كانت مشابهة للعزلة الصينية بنسبة 98.15 % (FJ598872) في حين كانت مشابهة للعزلة الاسترالية (AF218788) بنسبة 99.09 % (جدول 23) وأظهر الشكل (6) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة *Trichoderma viride* Y.N.135.Shahad اظهرت فيه بتفرعات منفصلة clades عن جميع العزلات .

جدول 23: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma viride* Y.N.135.Shahad المعزولة من محافظة بغداد وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI) نفسه.

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	GenBank Accession Number	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	*Trichoderma viride*	Y.N.135.Shahad	iraq	MZ970839	%100	2021
2	*Trichoderma viride*	18S	China	AF525230	%99.82	2002
3	*Hypocrea rufa*	18S	Germany	AJ301991	%99.82	2000
4	*Hypocrea rufa*	strain ZY-01	China	JX121089	% 99.70	2012
5	*Trichoderma viride*	GJS89-127	USA	AY489694	% 99.70	2003
6	*Trichoderma viride*	HS-F9	China	FJ598872	%99.15	2008
7	*Trichoderma viride*	1, 5.8S	Australia	AF218788	%99.09	1999



الشكل (6) شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma viride* Y.N.135.Shahad

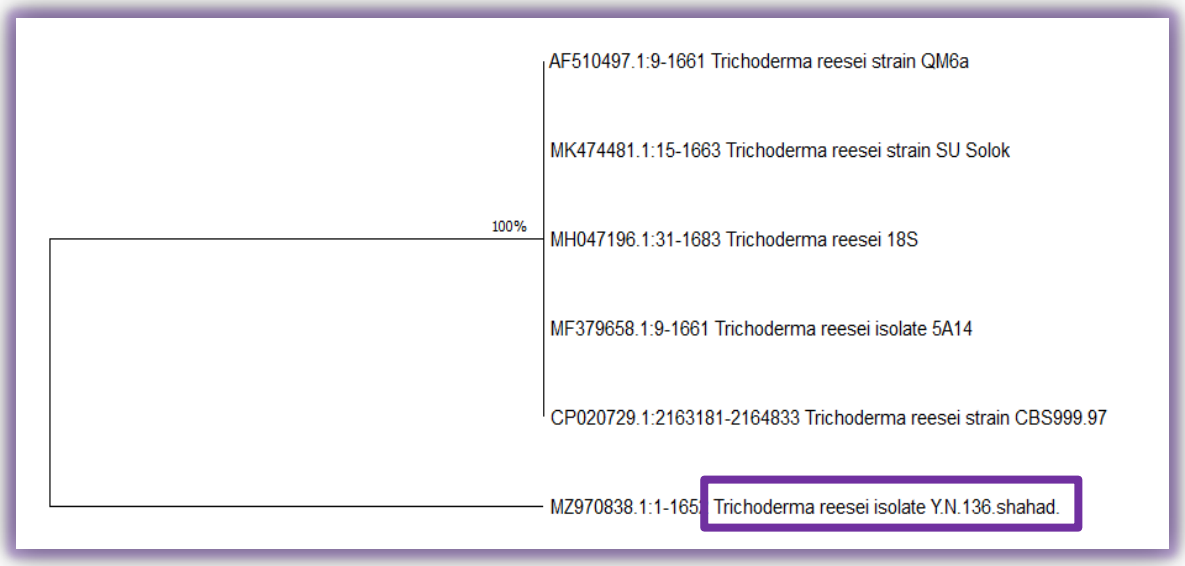
4_7_2: تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة *Trichoderma reesei* Y.N.136.Shahad ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) نفسه .

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر *Trichoderma reesei* Y.N.136.Shahad المعزول من ترب النباتات السليمة من محافظة بغداد مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (99.82%) مع العزلتين الألمانيتين (MH047196) (AJ301991) والعزلة التايوانية (CP020729.1) وبلغت نسبة التشابه الوراثي (99.98%) مع العزلة البرازيلية (MF379658) و كانت مشابهة للعزلة التايوانية بنسبة 99.82 % و كانت مشابهة للعزلة النيجيرية (MK474481) بنسبة 99.70 % في حين كانت مشابهة للعزلة الألمانية (AF510497.1) بنسبة 99.82 %(جدول 24) وأظهر الشكل (7) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن

العزلة (*trichoderma reesei* Y.N.136.Shahad) اظهرت فيه بتفرعات منفصلة clades عن جميع العزلات

جدول 24: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma reesei* Y.N.136.Shahad المعزولة من محافظة بغداد وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI) نفسه .

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	GenBank Accession Number	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	*Trichoderma reesei*	Y.N.136.Shahad	iraq	MZ970838.1	%100	2021
2	*Trichoderma reesei*	18S	Germany	MH047196	%99.82	2018
3	*Trichoderma reesei*	5A14	Brazil	MF379658	%99.98	2017
4	*Trichoderma reesei*	CBS999.97	Taiwan	CP020729.1	%99.82	2017
5	*Trichoderma reesei*	SU_Solok	Negeri	MK474481	% 99. 70	2019
6	*Trichoderma reesei*	strain QM6a	Germany	AF510497.1	%99.82	2002



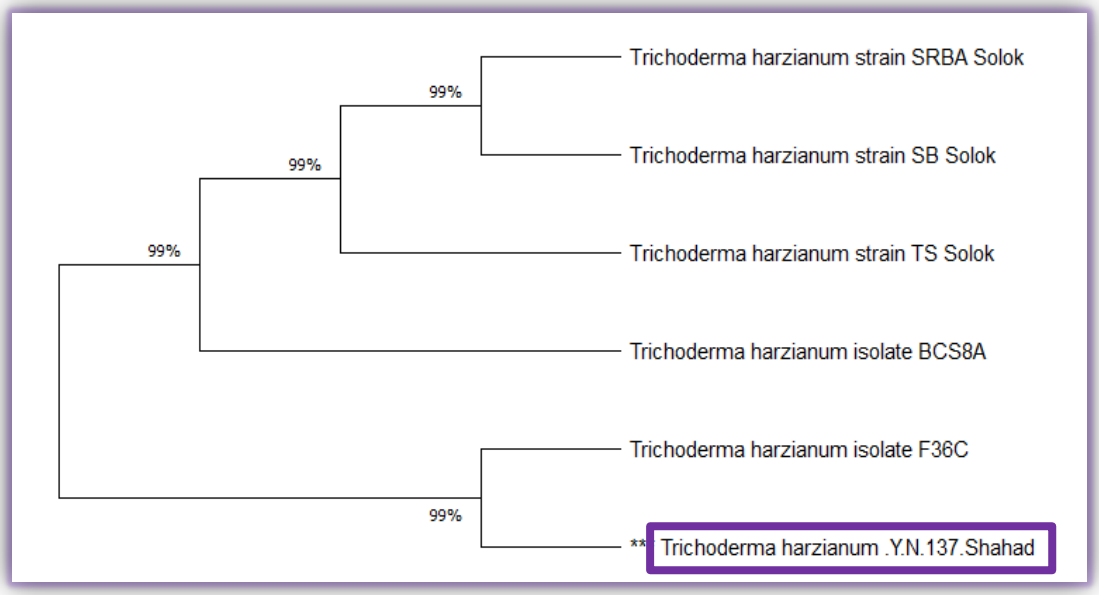
الشكل (7) شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma reesei* Y.N.136.Shahad

3-7-4: تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة *Trichoderma harzianum* Y.N.137.Shahad ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) نفسه .

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر *Trichoderma harzianum* Y.N.137.Shahad المعزول من محافظة الديوانية مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (99.51%) مع العزلة الكينية (MH015010.1) و عزلتين من الاندوسيا (MK474477.1) (MK474476.1) وعزلة نيجيريا (MK474478.1) في حين بلغت نسبة التشابه الوراثي (99.70%) مع العزلة الهندية (MW158368.1) (جدول 25) وأظهر الشكل (8) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة Y.N.137.Shahad اظهرت فيه بتفرعات منفصلة clades عن جميع العزلات .

جدول 25: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma harzianum* Y.N.137.Shahad المعزولة من محافظة الديوانية وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI) نفسه .

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	GenBank Accession Number	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	*Trichoderma harzianum*	Y.N.137.Shahad	iraq	MZ970767	%100	2021
2	*Trichoderma harzianum*	BCS8A	Kenya	MH015010.1	%99.51	2018
3	*Trichoderma harzianum*	F36C	India	MW158368.1	%99.70	2020
4	*Trichoderma harzianum*	TS_Solok	Negeri	MK474478.1	% 99.51	2019
5	*Trichoderma harzianum*	SRBA_Solok	Indonesia	MK474477.1	% 99.51	2019
6	*Trichoderma harzianum*	SB_Solok	Indonesia	MK474476.1	% 99.51	2019



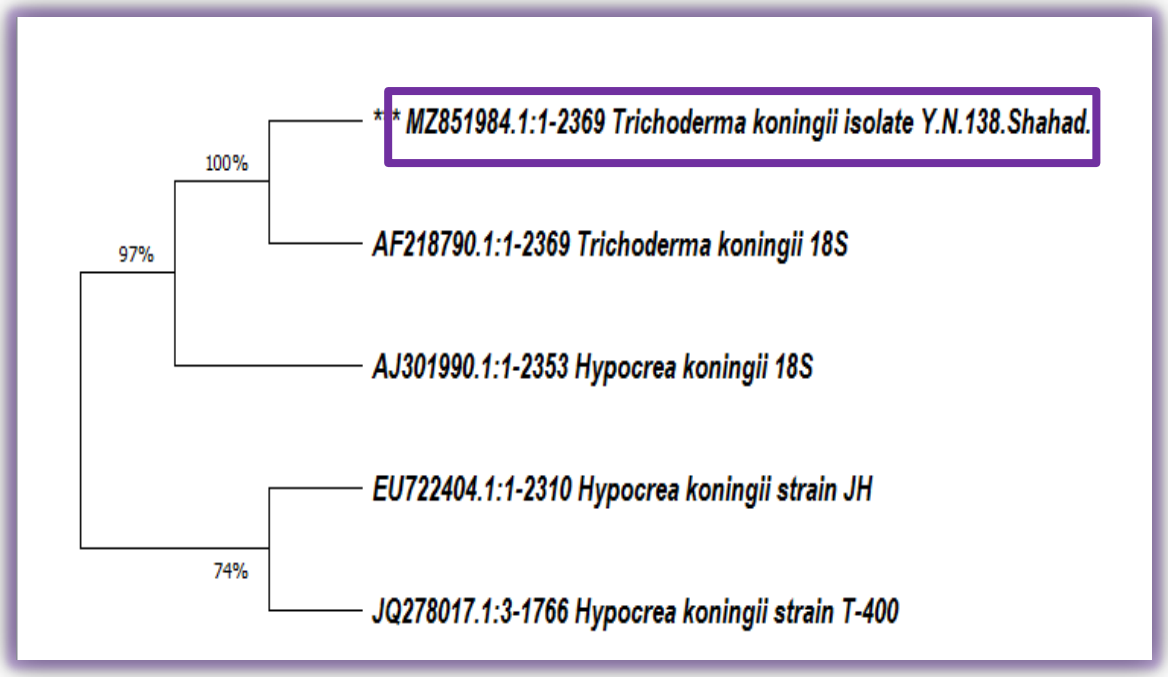
الشكل (8) شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma harzianum Y.N.137.Shahad*

4-7-4 : تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة *Trichoderma koningii Y.N.138.Shahad* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) نفسه .

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر *Trichoderma koningii Y.N.138.Shahad* المعزول من محافظة الديوانية مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (99.94%) مع العزلة الاسترالية (AF218790) و العزلة الالمانية (AJ301990) وكانت مشابهة للعزلة االكورية (EU722404) بنسبة 99.76 % في حين بلغت نسبة التشابه الوراثي (99.70%) مع العزلة الصينية (JQ278017) (جدول 26) وأظهر الشكل (9) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة (Y.N.139.Shahad) اظهرت فيه بتفرعات منفصلة clades عن جميع العزلات .

جدول 26: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma koningii Y.N.138.Shahad* المعزولة من محافظة الديوانية وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI) نفسه .

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	GenBank Accession Number	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	*Trichoderma koningii*	*Y.N.138.Shahad*	iraq	MZ851984	%100	2021
2	*Trichoderma koningii*	18S	Australia	AF218790	%99 .94	1999
3	Hypocrea koningii	strain JH	Korea	EU722404	% 99.76	2008
4	Hypocrea koningii	18S	Germany	AJ301990	% 99.94	2000
5	*Trichoderma koningii*	T-400	China	JQ278017	% 99. 70	2011



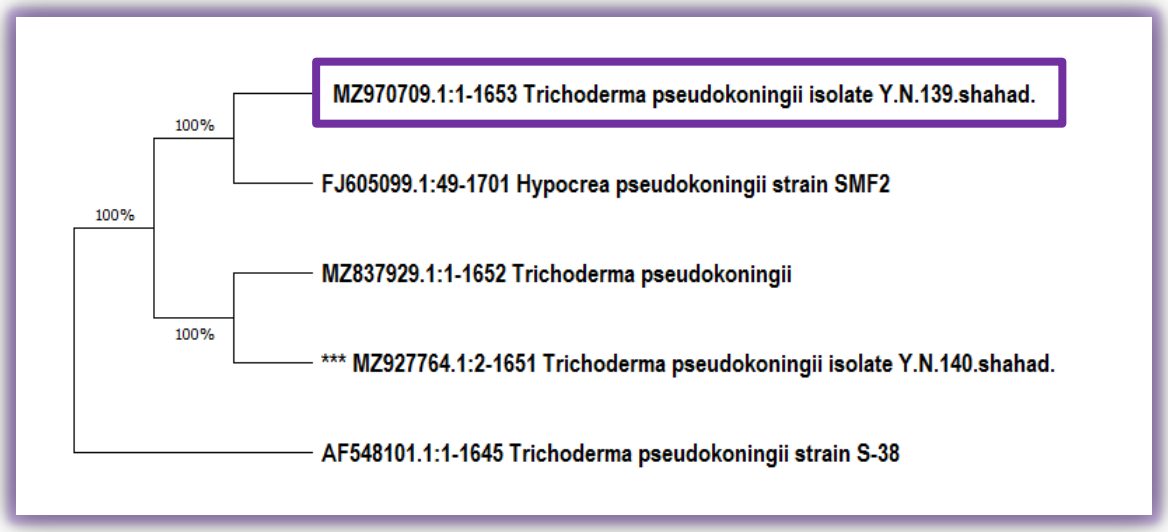
الشكل (9) شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma koningii Y.N.138.Shahad*

4-7- 5 : تحليل التتابع النيوكليوتيدي للفطر *Trichoderma pseudokoningii* Y.N.139.Shahad ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) نفسه .

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر *Trichoderma pseudokoningii Y.N.139.Shahad* المعزول من محافظة بابل مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (99.94%) مع العزلة السويدية (AF548101.1) و عزلة العراقية (MZ927764.1) وكانت مشابهة للعزلة الصينية (FJ605099.1) بنسبة 99.76 % في حين بلغت نسبة التشابه الوراثي (99.70%) مع العزلة العراقية (MZ837929.1) (جدول 27) وأظهر الشكل (10) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة Y.N.142.Shahad اظهرت فيه بتفرعات منفصلة clades عن جميع العزلات

جدول 27: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma pseudokoningii Y.N.139.Shahad* المعزولة من محافظة بابل وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI) نفسه .

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	GenBank Accession Number	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	*Trichoderma pseudokoningii*	Y.N.139.Shahad	iraq	MZ970709	%100	2021
2	*Trichoderma pseudokoningii*	strain S-38 18S	Sweden	AF548101.1	% 99.94	2003
3	*Hypocrea pseudokoningii*	strain SMF2	China	FJ605099.1	% 99.76	2009
4	*Trichoderma pseudokoningii*	Y.N.140.Shahad	iraq	MZ927764.1	%99 .94	2021
5	*Trichoderma pseudokoningii*	*Y.N.128.Saad*	iraq	MZ837929.1	% 99. 70	2021



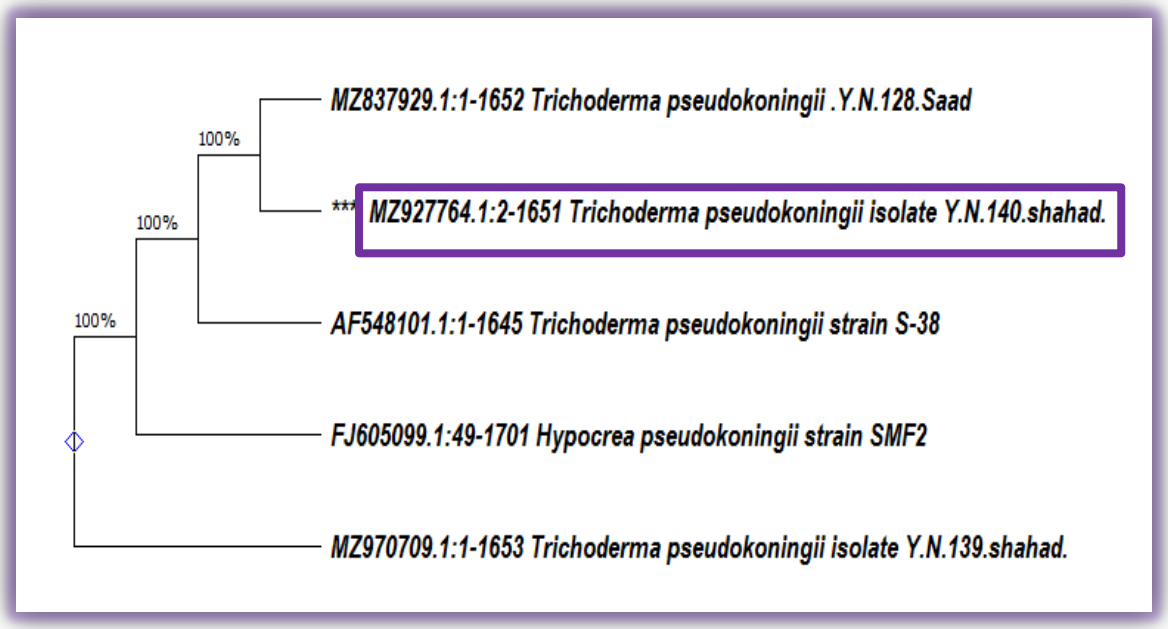
الشكل (10) شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية (Trichoderma pseudokoningii Y.N.139.Shahad)

6-7-4 : تحليل التتابع النيوكليوتيدي *لعزلة Trichoderma pseudokoningii Y.N.140.Shahad* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) نفسه .

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر *Trichoderma pseudokoningii Y.N.140.Shahad* المعزول من محافظة بابل مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (100%) مع العزلة العراقية (MZ837929.1) وكانت مشابهة مع العزلة الصينية (FJ605099.1) بنسبة 99.76 % وبنسبة تشابه 99.94 % مع العزلة السويدية في حين بلغت نسبة التشابه الوراثي (99.70%) مع العزلة العراقية (MZ970709) (جدول 28) وأظهر الشكل (11) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة Y.N.140.Shahad اظهرت فيه بتفرعات منفصلة clades عن جميع العزلات .

جدول 28: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma pseudokoningii* Y.N.140.Shahad المعزولة من محافظة الموصل وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI) نفسه .

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	GenBank Accession Number	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	*Trichoderma pseudokoningii*	Y.N.140.Shahad	iraq	MZ927764.1	%100	2021
2	*Trichoderma pseudokoningii*	*Y.N.128.Saad*	iraq	MZ837929.1	%100	2021
3	*Hypocrea pseudokoningii*	strain SMF2	China	FJ605099.1	% 99.76	2009
4	*Trichoderma pseudokoningii*	strain S-38 18S	Sweden	AF548101.1	% 99.94	2003
5	*Trichoderma pseudokoningii*	Y.N.139.Shahad	iraq	MZ970709	% 99. 70	2021



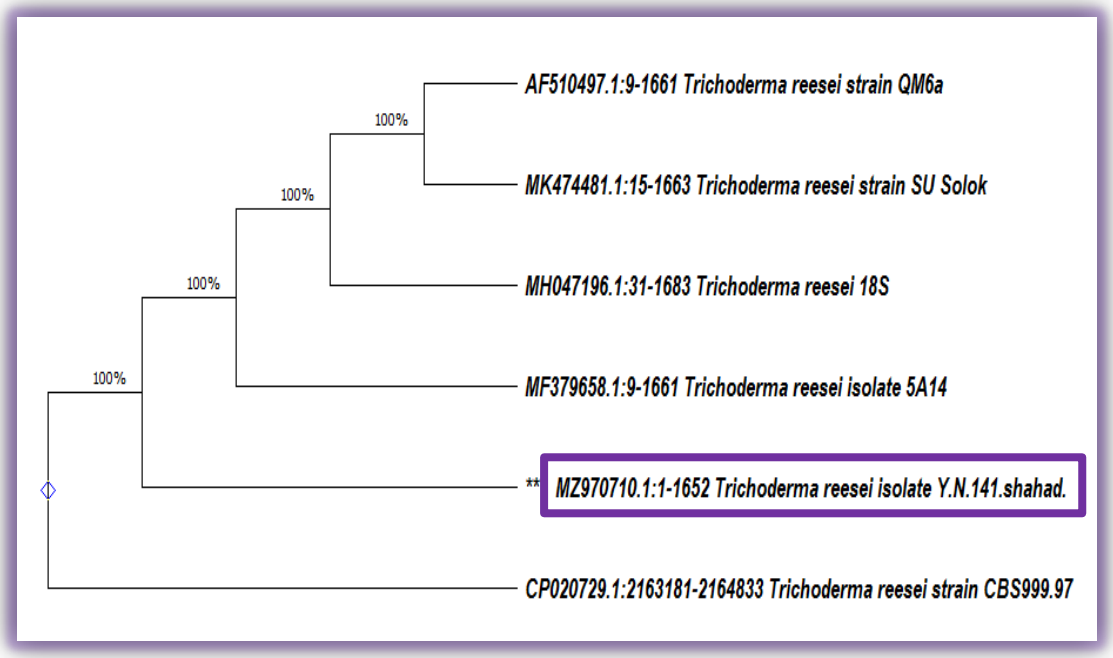
الشكل (11) شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma pseudokoningii* Y.N.140.Shahad

4-7-7:تحليل التتابع النيوكليوتيدي للفطر *Trichoderma reesei Y.N.141.Shahad* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) نفسه .

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر ***Trichoderma reesei*** *Y.N.141.Shahad* المعزول من محافظة كربلاء مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية NCBI)) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (99.82%) مع العزلة التايوانية (CP020729.1) و عزلتين المانيتين (MH047196) (AF510497.1) وكانت مشابهة للعزلة النيجيريا(MK474481) بنسبة 99.70 % في حين بلغت نسبة التشابه الوراثي (99.98%) مع العزلة البرازيلية (MF379658) (جدول 29) وأظهر الشكل (12) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة (Y.N.141.Shahad) اظهرت فيه بتفرعات منفصلة clades عن جميع العزلات .

جدول 29: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma reesei Y.N.141.Shahad* المعزولة من محافظة الموصل وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI) نفسه .

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	GenBank Accession Number	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	*Trichoderma reesei*	Y.N.141.Shahad	iraq	MZ970710	%100	2021
2	*Trichoderma reesei*	18S	Germany	MH047196	%99.82	2018
3	*Trichoderma reesei*	5A14	Brazil	MF379658	%99.98	2017
4	*Trichoderma reesei*	CBS999.97	Taiwan	CP020729.1	%99.82	2017
5	*Trichoderma reesei*	SU_Solok	Negeri	MK474481	% 99. 70	2019
6	*Trichoderma reesei*	strain QM6a	Germany	AF510497.1	%99.82	2002



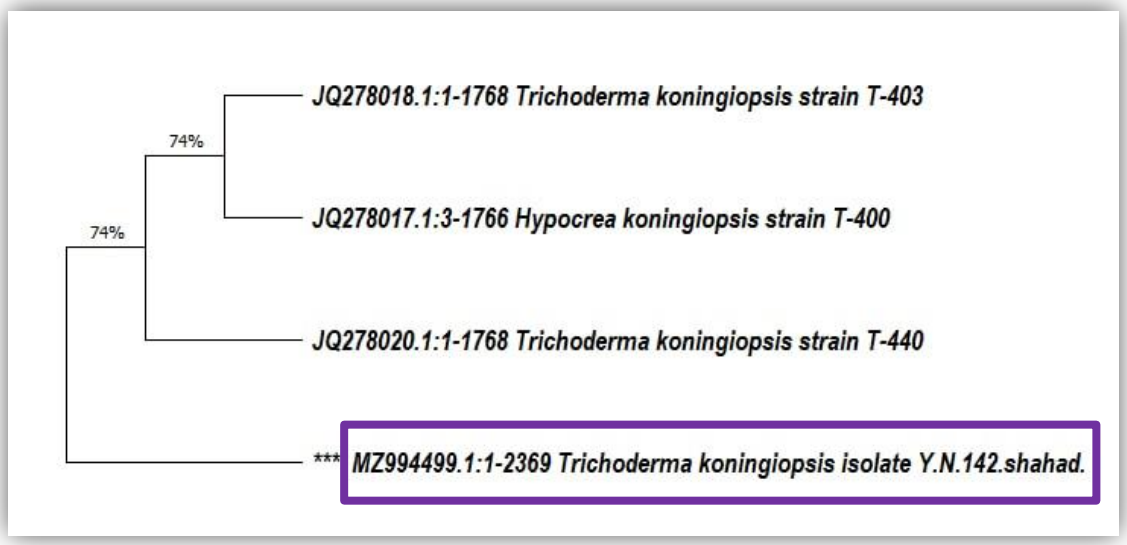
الشكل (12) شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma reesei Y.N.141.Shahad*

4-7-8: تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة الفطر *Trichoderma koningiopsis Y.N.142.Shahad* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) نفسه .

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر Y.N.142.Shahad المعزول من محافظة الموصل مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية(NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (99.10%) مع العزلة الصينية (JQ278018.1) وبلغت نسبة التشابه الوراثي (99.04%) مع العزلة الصينية (JQ278020.1) في حين كانت مشابهة للعزلة الصينية بنسبة 98.41 % (JQ278017.1)(جدول 30) وأظهر الشكل (13) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة Y.N.142.Shahad اظهرت فيه بتفرعات منفصلة clades عن جميع العزلات.

جدول 30: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma koningiopsis* Y.N.142.Shahad المعزولة من محافظة الموصل وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI) نفسه .

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	GenBank Accession Number	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	*Trichoderma koningiopsis*	Y.N.142.Shahad	iraq	MZ994499.1	%100	2021
2	*Trichoderma koningiopsis*	strain T-403	China	JQ278018.1	%99.10	2011
3	*Trichoderma koningiopsis*	strain T-440	China	JQ278020.1	%99.04	2011
4	*Trichoderma koningiopsis*	strain T-400	China	JQ278017.1	%98.41	2011



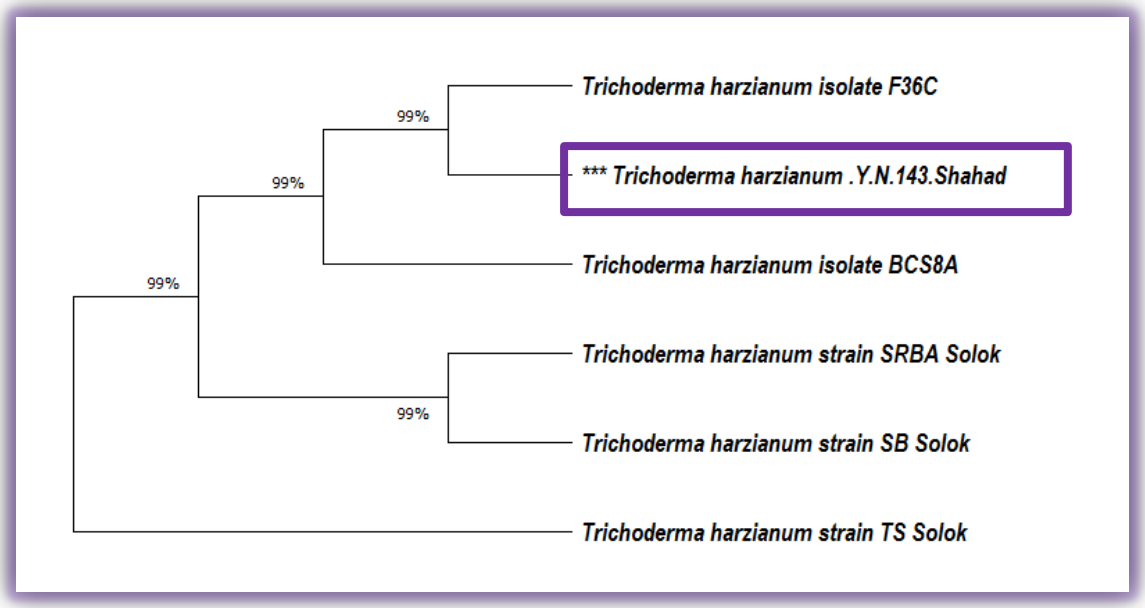
الشكل (13) شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma koningiopsis Y.N.142.Shahad*

9-7-4 : تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة الفطر *Trichoderma harzianum Y.N.143.Shahad* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) نفسه .

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر(*Trichoderma harzianum Y.N.143.Shahad* المعزول من محافظة النجف مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية(NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت 100% مع العزلة الهندية (MW158368.1) وكانت مشابهة بنسبة 99.51% مع العزلة الكينية (MH015010.1) و عزلتين من الاندوسيا (MK474477.1) (MK474476.1) وكانت مشابهة للعزلة النيجيرية (MK474478.1) بنسبة 99.71% (جدول 31) وأظهر الشكل (14) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة *Trichoderma harzianum Y.N.143.Shahad* اظهرت فيه بتفرعات منفصلة clades عن جميع العزلات .

جدول 31: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma harzianum* Y.N.143.Shahad المعزولة من محافظة الموصل وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI) نفسه .

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	GenBank Accession Number	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	*Trichoderma harzianum*	Y.N.143.Shahad	iraq	MZ853739	%100	2021
2	*Trichoderma harzianum*	F36C	India	MW158368.1	% 100	2020
3	*Trichoderma harzianum*	TS_Solok	Negeri	MK474478.1	% 99.71	2019
4	*Trichoderma harzianum*	BCS8A	Kenya	MH015010.1	%99.51	2018
5	*Trichoderma harzianum*	SRBA_Solok	Indonesia	MK474477.1	% 99.51	2019
6	*Trichoderma harzianum*	SB_Solok	Indonesia	MK474476.1	% 99.51	2019



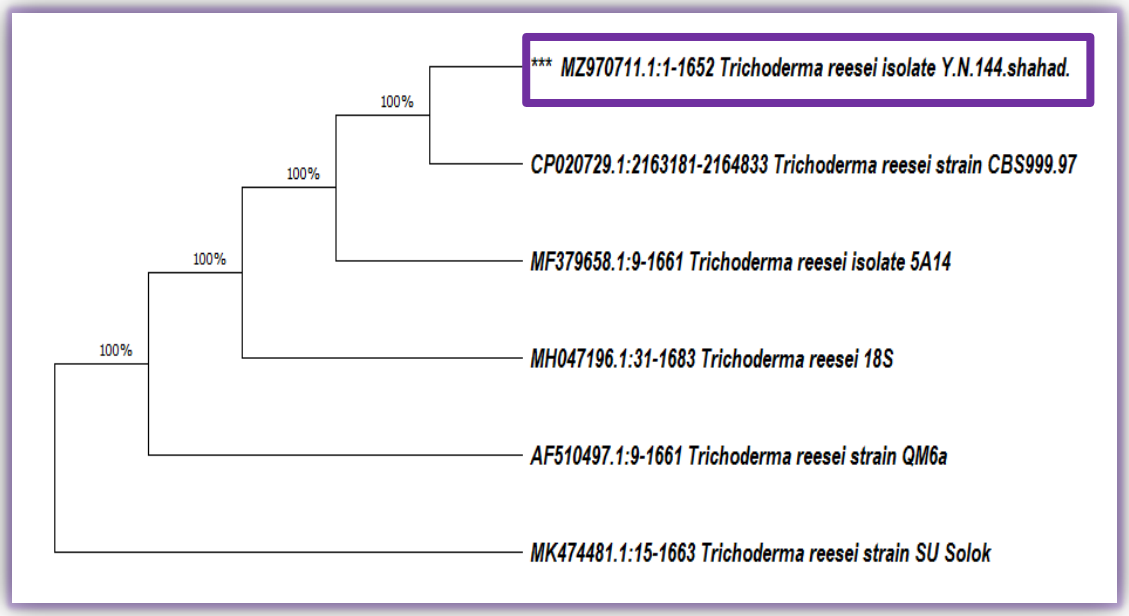
الشكل (14) شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma harzianum* Y.N.143.Shahad

4_7_10 تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة الفطر *Trichoderma reesei* Y.N.144.Shahad ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) نفسه .

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر *T.reesei Y.N.144.Shahad* المعزول من ترب النباتات السليمة من محافظة النجف مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت 99.82% مع العزلتين الالمانيتين(MH047196) (AJ301991) و العزلة التايوانية (CP020729.1) وبلغت نسبة التشابه الوراثي 99.98%مع العزلة البرازيلية (MF379658) في حين كانت مشابهة للعزلة النيجيرية (MK474481) بنسبة 99.70 % (جدول 32) وأظهر الشكل (15) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة *Trichoderma reesei* Y.N.144.Shahad اظهرت فيه بتفرعات منفصلة clades عن جميع العزلات .

جدول 32: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma reesei Y.N.144.Shahad* المعزولة من محافظة النجف وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI) نفسه .

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	GenBank Accession Number	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	*Trichoderma reesei*	Y.N.144.Shahad	iraq	MZ970711	%100	2021
2	*Trichoderma reesei*	18S	Germany	MH047196	%99.82	2018
3	*Trichoderma reesei*	5A14	Brazil	MF379658	%99.98	2017
4	*Trichoderma reesei*	CBS999.97	Taiwan	CP020729.1	%99.82	2017
5	*Trichoderma reesei*	SU_Solok	Negeri	MK474481	% 99. 70	2019
6	*Trichoderma reesei*	strain QM6a	Germany	AF510497.1	%99.82	2002



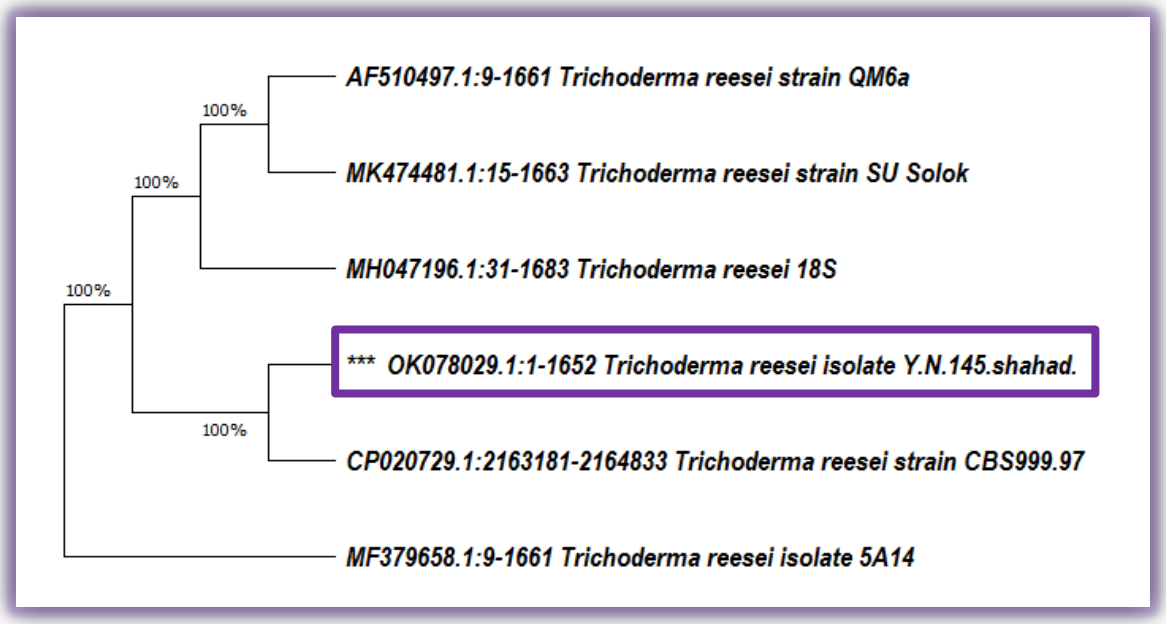
الشكل (15) شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma reesei* Y.N.144.Shahad

11-7-4: تحليل التتابع النيوكليوتيدي لعزلة *Trichoderma reesei Y.N.145.Shahad* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU مع العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) نفسه .

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر *Trichoderma reesei Y.N.145.Shahad* المعزول من محافظة كركوك مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية(NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت 99.82% مع العزلة التايوانية (CP020729.1) و عزلتين المانيتين (MH047196) (AF510497.1) وكانت مشابهة للعزلة النيجيريا(MK474481) بنسبة 99.70 % في حين بلغت نسبة التشابه الوراثي 99.98% مع العزلة البرازيلية (MF379658) (جدول 33) وأظهر الشكل (16) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة (*Y.N.145.Shahad*) اظهرت فيه بتفرعات منفصلة clades عن جميع العزلات

جدول 33: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين SSU لعزلة الفطر *Trichoderma reesei Y.N.145.Shahad* المعزولة من محافظة الموصل وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI) نفسه .

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	GenBank Accession Number	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	*Trichoderma reesei*	Y.N.145.Shahad	iraq	OK078029	%100	2021
2	*Trichoderma reesei*	18S	Germany	MH047196	%99.82	2018
3	*Trichoderma reesei*	SU_Solok	Negeri	MK474481	% 99. 70	2019
4	*Trichoderma reesei*	strain QM6a	Germany	AF510497.1	%99.82	2002
5	*Trichoderma reesei*	5A14	Brazil	MF379658	%99.98	2017
6	*Trichoderma reesei*	CBS999.97	Taiwan	CP020729.1	%99.82	2017



الشكل (16) شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor joining للعزلة الفطرية *Trichoderma reesei Y.N.145.Shahad*

4_ 8 : الخصائص الكيميائية للتربة Soil chemical properties المعزول منها عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* sp. المنتخبة

اظهرت نتائج الكشف عن خصائص التربة من تأثير الاس الهايدروجيني (PH) وايصالية التربة (EC) والمحتوى الكلي للمادة العضوية ، بأن مستويات مختلفة من الاسس الهيدروجينية والايصالية الكهربائية والمادة العضوية (جدول 33) لها تاثيرات متباينة في نمو وتواجد عزلات الفطر *Trichoderma* spp. في هذه الترب ، وبشكل عام كانت هذه الخصائص ملائمة لنمو عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المختلفة وذلك لانه يتميز بقدرة كبيرة بالنمو والانتشار بالبيئات المختلفة وخاصة التربة والتي تتباين فيها من تأثير الاس الهايدروجيني (PH) وايصالية التربة (EC) والمحتوى الكلي للمادة العضوية وامكانية تواجد انواع هذا الفطر بجميع انواع الترب العراقية .

أن تأثير الاس الهيدروجيني (PH) في نمو الفطريات المختلفة يكمن في دورة تنظيم نفاذية الايونات السالبة و الموجبة عبر الأغشية الخلوية ، اذ أن حركة هذه الايونات عبر الغشاء البلازمي للخلية تصبح في حالة توازن عندما ينمو الفطر عند أس هيدروجيني مثالي ، أما في حالة حدوث زيادة في الاس الهيدروجيني عن ذلك الحد فأن ذلك يؤدي إلى زيادة نفاذية الايونات السالبة على

حساب الايونات الموجبة مؤديا إلى حدوث حالة اضطراب في نفاذية الأغشية الخلوية مؤثرا ذلك على نمو الفطر (Shresti، 2005). كما يعد الأس الهيدروجيني المتعادل (PH7) هو الأفضل في الحفاظ على حالة العناصر المغذية في وسط النمو و جاهزيتها لنمو الفطر، أما في حالة الزيادة أو النقصأن عن ذلك الحد (PH7) فأن بعض العناصر المغذية تتحد و تكّون معقدات مما جعلها غير جاهزة لنمو الفطر ، فضلا عن أن بعض تلك المعقدات قد تكون سامة للفطر و خصوصا المعقدات الكيميائية المتكّونة من اتحاد بعض العناصر مثل المغنيسيوم و الخارصين و الفوسفات (Kavanagh، 2005). ذكر Singh و آخرون (2014) أن افضل مدى من الأس الهيدروجيني في وسط النمو للفطر *Trichoderma* spp. تراوح بين 5.5-7.0. كما بين Isabel و آخرون (2000) أن للفطريات بشكل عام القابلية على النمو في مدى واسع من الأسس الهيدروجيني يتراوح بين 3-9.

تبين النتائج المثبتة في جدول (34) أن لمستويات الملوحة المستخدمة في هذه الدراسة (11.32 و 5.50 و 6.58 و 1.14 و 8.43 و 6.63 و 6.45 و 9.36 و 9.47 و 6.91 ديسي سيمنز/ م^{1}) تأثيرات متباينة في نمو عزلات الفطر *Trichoderma* spp. من خلال نتائج هذه التجربة، اثبت أن جميع عزلات الفطر *Trichoderma* spp. لها القدرة في النمو في المستويات الملحية المستخدمة في هذه الدراسة مع ملاحظة عدم تأثر بعضها تمأما بأي من المستويات الملحية و عدم اختلافها عن معاملة المقارنة، مما يشجع استخدام تلك العزلات في بيئات نمو النبات ذات المستويات الملحية متباينة و استغلال الآليات المختلفة لتلك العزلات التي يكون لوجودها فعلا مشتركا في مقأومة مسببات أمراض النبات و تحسين مؤشرات نمو النبات. فقد بين Poosapati وآخرون (2014) تحمل أنواع الفطر *T. asperellum* لتراكيز ملحية عاليه نتيجة امتلاكها عدد من السكريات مثل Mannose و Trehalose وRaffinose والتي تعمل على حماية خلايا الفطر في حالة تعرضها لظروف غير طبيعية.

اما المادة العضوية بالتربة فتساهم في بناء حبيبات التربة أو تركيبها وتؤثر على قابلية التربة للاحتفاظ بالماء فتزيدها من 10 – 25 مرة بقدر وزنها أي إن المادة العضوية مخزن للماء في التربة لصالح النبات النامي ورفع السعة التبادلية للايونات الموجبة من قابلية التربة للاحتفاظ بالماء فضلاً عن تحسينها مسامية التربة وتنظيمها لحركة الماء والهواء وتبادل الغازات و زيادة المقدرة التنظيمية للتربة وان جميع تلك الصفات لها تأثير مباشر على احياء التربة ومن بينها الفطريات وخاصة الفطر الاحيائي *Trichoderma* spp. فان كلما ازدادت المادة العضوية في التربة ينعكس بشكل ايجابي على نمو وتواجد مثل هذه الفطريات (Dinel وآخرون 1991وBladock

وNelson، 2000) . اذ يستفيد الفطر *Trichoderma* spp. من المواد المفرزة من جذور النباتات الحية وتتفاعل معها فضلا عن المواد المتحررة جراء تحلل المواد العضوية في التربة ، ولقد امكن التعرّف على كثير من نوعية هذه الإفرازات وكميتها من الناحية الكيميائية ووجد أنها تحتوي على مواد كربوهيدراتية وسكريات وبعض الأحماض المعدنية و العضوية و الأمينية و بعض العناصر المعدنية وكثير من المنشطات و المثبطات و بعض الفينولات الضارة و النافعة (IAS, 1996) .

جدول(34) الخصائص الكيميائية للترب المعزول منها عزلات الفطر*Trichoderma sp*.

الخصائص الكيميائية للترب المعزول منها عزلات الفطر *Trichoderma sp*.				
ت	العزلات الفطرية	فاعلية التربة (PH)	ايصالية التربة (EC)	المحتوى من المواد العضوية
1	العزلة T.B4	5.00	2.42	11.24
2	العزلة T.B10	6.70	8.73	10.55
3	العزلة T.D7	4.50	11.32	20.55
4	العزلة T.D9	5.00	5.50	18.77
5	العزلة T.H7	6.50	1.14	23.56
6	العزلة T.H8	5.50	6.58	22.04
7	العزلة T.K8	8.30	8.43	19.89
8	العزلة T.N4	7.50	6.63	21.76
9	العزلة T.N9	4.20	6.45	16.40
10	العزلة T.M2	6.70	9.36	8.99
11	العزلة T.R10	8.00	9.47	10.76
L.S.D. ….(0.05)		6.17	6.91	16.77

9-4 : اختبار التضاد الحيوي لعدد من عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin ومركبات الاستحثاث فيما بينها مختبريا على وسط PDA.

أظهرت نتائج التضاد الحيوي لعزلات الفطر *Trihcoderma* spp. ان العزلات T.M2 ، T.N4 ، T.B4 لم تظهرأي قدرة تضادية فيما بينها عند اختبارها على وسط البطاطا دكستروز اكار (PDA) نفسه (شكل17). مما يؤهل استخدام هذه العزلات معا في البيئة نفسها و منها بيئة نمو

النبات دون وجود قدرة تضادية فيما بينها و لاهميتها في حماية النبات من المسببات المرضية .في حين أظهرت العزلتين T.D9 و T.H7 موشراً تضادياً حيوياً بينهما وبين بقية العزلات الفطرية .

شكل (17) : اختبار التضاد الحيوي لعدد من عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري الكليوتوكسين ومركبات الاستحثاث فيما بينها مختبريا على وسط PDA

4- 10: اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin ومركبات الاستحثاث ضد العزلات الفطرية الممرضة حقلياً في الاصص البلاستيكية .

أظهرت النتائج جدول (35) كفاءة أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في تثبيط نمو الفطر الممرض *Fusarium* sp. عند استخدمها بشكل منفرد حيث تراوحت النسبة المئوية للمرض بين (60.00_00.00%) وشدة المرض بين (65.00_00.00%) و ازداد نسب التثبيط للفطر الممرض معنويا عند وجود اكثر من نوع من أنواع الفطر *Trichoderma* spp. قياسا بمعاملة المقارنة للفطر الممرض لوحظ أن اعلى نسبة لتثبيط نمو الفطريات الممرضة 100% كأنت عند وجود العزلتين (T. B4 + T. N4)،(T. M2 + T. N4)، (T. B4 + T. M2) وعند تداخل اكثر من نوع عزلات من الفطر *Trichoderma* spp. (T.N4 + T. B4+ T. M2) .

جدول (35) التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma sp.* ضد العزلة الفطر الممرض *Fusarium sp*. حقلياً في الاصص البلاستيكية .

التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* ضد العزلة الفطر الممرض *Fusarium sp* .			
ت	المعاملات	النسبة المئوية للمرض	النسبة المئوية لشدة المرض
1	(المقارنة1) بدون اضافة أي فطر	0.00	0.00
2	(المقارنة2) اضافة الممرض فقط	96.66	65.55
3	اضافة العزلة (T. N4) + الممرض	60.00	36.66
4	اضافة العزلة (T. M2) + الممرض	50.00	33.33
5	اضافة العزلة (T. B4) + الممرض	36.66	24.44
6	اضافة العزلة (T. N4) + (T. B4) + الممرض .	0.00	0.00
7	اضافة العزلة (T. N4) + (T. M2) + الممرض	0.00	0.00
8	اضافة العزلة (T. M2) + (T. B4) + الممرض	0.00	0.00
9	اضافة العزلة (T. M2) + (T. B4) +(T.N4)+ الممرض	0.00	0.00
	L.S.D. ….(0.05)	27.04	----

أظهرت النتائج جدول (36) كفاءة أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في تثبيط نمو الفطر الممرض *Pythium* sp. عند استخدمها بشكل منفرد حيث تراوحت النسبة المئوية للمرض بين (00.00_56.00%) وشدة المرض بين (00.00_35.00) و ازداد نسب التثبيط للفطر الممرض معنويا عند وجود اكثر من نوع من أنواع الفطر *Trichoderma* spp. قياسا بمعاملة المقارنة للفطر الممرض لوحظ أن اعلى نسبة لتثبيط نمو الفطريات الممرضة 100% كأنت عند وجود العزلتين (T. B4 + T. N4)،(T. M2 + T. N4)، (T. B4 + T. M2) وعند تداخل اكثر من عزلة من عزلات الفطر *Trichoderma* spp. (T.N4 + T. B4+ T. M2) .

جـدول (36) التـأثير التـآزري للتوليفـة بـين عـزلات الفطـر *Trichoderma* ضـد العزلة الفطر الممرض *Pythium sp*. حقلياً في الاصص البلاستيكية .

التـأثير التـآزري للتوليفـة بـين عـزلات الفطـر *Trichoderma* ضـد العزلـة الفطـر الممرض *Pythium sp*.			
ت	المعاملات	النسبة المئوية للمرض	النسبة المئوية لشدة المرض
1	(المقارنة1) بدون اضافة أي فطر	0.00	0.00
2	(المقارنة2) اضافة الممرض فقط	93.33	51.11
3	اضافة العزلة (T. N4) + الممرض	56.66	35.55
4	اضافة العزلة (T. M2) + الممرض	43.33	26.66
5	اضافة العزلة (T. B4) + الممرض	36.66	24.44
6	اضافة العزلة (T. N4) + (T. B4) + الممرض .	0.00	0.00
7	اضافة العزلة (T. N4) + (T. M2) + الممرض	0.00	0.00
8	اضافة العزلة (T. M2) + (T. B4) + الممرض	0.00	0.00
9	اضـــافة العزلـــة (T. M2) + (T. B4) +(T.N4)+ الممرض	0.00	0.00
	L.S.D. ….(0.05)	25.55	-----

أظهرت النتائج جدول (37) كفاءة أنواع الفطر *Trichoderma* spp. في تثبيط نمو الفطر الممرض *Rhizoctonia* sp. عند استخدمها بشكل منفرد حيث تراوحت النسبة المئوية للمرض بين (00.00_56.00%) وشدة المرض بين (00.00_35.00) و ازداد نسب التثبيط للفطر الممرض معنويا عند وجود اكثر من نوع من أنواع الفطر *Trichoderma* spp. قياسا بمعاملة المقارنة للفطر الممرض. لوحظ أن اعلى نسبة لتثبيط نمو الفطريات الممرضة (100%) كأنت عند وجود العزلتين (T. B4 + T. N4)،(T. M2 + T. N4)، (T. B4 + T. M2) وعند تداخل اكثر من عزلة من عزلات الفطر *Trichoderma* spp. (T. B4+ T. M2 + T.N4) .

جـدول (37) التـأثير التـآزري للتوليفـة بـين عـزلات الفطـر *Trichoderma* ضـد العزلة الفطر الممرض *Rhizoctonia sp*. حقلياً في الاصص البلاستيكية .

التـأثير التـآزري للتوليفـة بـين عـزلات الفطـر *Trichoderma* ضـد العزلـة الفطـر الممرض *Rhizoctonia sp* .			
ت	المعاملات	النسبة المئوية للمرض	النسـبة المئويـة لشدة المرض
1	(المقارنة1) بدون اضافة أي فطر	0.00	0.00
2	(المقارنة2) اضافة الممرض فقط	96.66	65.55
3	اضافة العزلة (T. N4) + الممرض	56.66	35.55
4	اضافة العزلة (T. M2) + الممرض	40.00	23.33
5	اضافة العزلة (T. B4) + الممرض	33.33	17.77
6	اضافة العزلة (T. N4) + (T. B4) + الممرض .	0.00	0.00
7	اضافة العزلة (T. N4) + (T. M2) + الممرض	0.00	0.00
8	اضافة العزلة (T. M2) + (T. B4) + الممرض	0.00	0.00
9	اضـافة العزلـة (T. M2) + (T. B4) +(T.N4)+ الممرض	0.00	0.00
(0.05)….L.S.D.		25.18	----

و لعل من اهم الاسباب التي ادت الى تثبيط نمو العزلات الفطرية قدرة هذا الفطر الحيوي على انتاج السم الفطري Gliotoxin له دور فعال في تثبيط عدد من العزلات الفطرية . إذ تعمل على حماية النباتات من الأمراض من خلال كبح المسببات المرضية من خلال وجودها بالتربة في منطقة حول الجذور أو تحفز عوامل المكافحةمثل تحفيز النبات على أنتاج منظمات النمو مثلIAA (Indole acetic acid) والمركبات المتطايرة المفيدة .

اذ اشارت الدراسات الى إمكانية تحفيز مقاومة نباتات الخيار ضد الإصابة بفطر البياض الدقيقي بواسطة فطر المكافحةالحيوية *T. harzianum* وقد تبيّن أن سقي النباتات براشح فطر المكافحة الحيوية أدى الى خفض تجرثم الفطر *P. xanthii* على أوراق الخيار الى حوالي 53 % مقارنة مع معاملة السيطرة (عبيد والجنابي، 2013) . امكن إنتاج العديد من المبيدات الحيوية المنتجة من الفطر *Trichoderma* spp. التي اثبتت كفاءتها العالية في حماية الكثير من النباتات من مسببات الامراض وتحفيز نمو النبات وغيرها (Harman و اخرون، 2004و Vinale و اخرون ، 2009 و Montealegre و اخرون، 2010). تمت دراسة هذه العوامل في المكافحة الحيوية على نطاق واسع ضد مسببات امراض النبات نظرًا لقدرتها على تقليل عدد مسببات

الأمراض النباتية بما في ذلك *Fusarium* spp. و *Rizochtonia* spp. و *Pythium* spp. وغيرها والتي تسبب امراض الذبول وموت البادرات في الكثير من النباتات (Inovejas و Divina ، 2018) كان الهدف من الدراسة هو تقييم الظروف الغذائية والبيئية التي تفضل زيادة إنتاج هذه التراكيب ، باستخدام عزلتين من الفطر *T. asperellum* .

اذ تم تقييم 5 عوامل متغيرة وهي : مصدر الكربون ، وتركيز الكربون ، ونسبة C: N ، والسلالة الفطرية ، ومصدر النيتروجين ، اذ أشارت النتائج إلى أن جميع هذه المتغيرات اظهرت تأثيرات معنوية في انتاج MS. وهي مصادر كربونية ونيتروجين غير مكلفة قد تسمح في توسيع نطاق هذا المبيد الحيوي . (Pakora, واخرون 2018)

أن استخدام اختبارات الزراعة المزدوجة بين B. cinerea وعزلات العوامل الحيوية *T.harzianum* و *T. viride* أوضحت النتائج أن المواد المتطايرة للعزلات نفسها من *T. harzianum* و *T. viride* حققت أعلى معدل تثبيط ضد B. cinerea بلغ 77٪ (T1، Bioconte). معاملة السيطرة الملوثة باستخدام طرق إضافة مختلفة (B1 = B. cinerea، B2 = T. *harzianum* أو *T. viride + B. cinerea*، B3 = *B2 + T. harzianum* أو *T. viride* بعد 5 أيام بالإضافة إلى B. *cinerea* و B4 = B3 + بعد 10 أيام من إضافة B3) طرق العلاج كانت B4 والتي قللت من الإصابة وشدة مرض العفن الرمادي على الطماطم (صنف وجدان) والباذنجان (صنف برشلونة) (Al-Esawee و AL-Taae ، 2016) وقد أجريت دراسة لتقييم كفاءة نوعين من *T.harzianum* و *T.viride* واثنين من عزلات فطر (*Glomus Mcorrhizal (moseae* (G1 و G2) ومزيجهم في تعزيز نمو شتلات الطماطة وأظهرت النتائج أن جميع معاملات العوامل الحيوية أدت إلى انخفاض معنوي في الفترة المطلوبة لبزوغ البادرات مقارنة بمعاملة السيطرة وزيادة نسبة ظهور الشتلات لكن العزلة *T. harzianu* + G1، *T. harzianum* + G2 كانت الأفضل. أظهرت النتائج أيضًا أن جميع العوامل الحيوية وتوليفاتها أدت إلى زيادة معنوية في معظم معاملات نمو النبات .(عبد السادة واخرون ،2012) أن أنخفاض نسب أنبات البذور تحت تأثير العزلات الفطرية قد يعود إلى اختلاف تلك العزلات في كمية و طبيعة المواد المنتجة و منها الأنزيمات المحللة و السموم التي تؤثر على أجنة البذور و منع أنباتها (Stack و اخرون ، 2017).

تتمكن بعض انواع .*Trichoderma* spp من العيش في خلايا النبات دون أنَّ تحدث اثاراً سلبية للنبات و انما لها دور في تشجيع نمو و تطوير النبات مثل تحفيز النظام الدفاعي للنبات و زيادة التمثيل الغذائي و انتاج الطاقة من خلال انتاجها لعدد واسع من الانزيمات و منها تلك المحللة لجدران خلايا الفطر الممرض بالإضافة الى استحثاث المكافحة الجهازية للنبات (Saldajeno واخرون 2014). استخدم الفطر *T. harzianum* بكفاءة عالية في مقاومة الفطر *R. solani* المسبب لمرض سقوط البادرات على الطماطة (الشعبي و اخرون، 2007). كما اثبت Singh و اخرون (2019) أنَّ الفطر *T.asperellum* قد وفر حماية كاملة ضد الفطر الممرض *F.oxysporum. F.lycopersici* المسبب لمرض الذبول الفيوزارمي على الطماطة و زيادة نمو النبات من خلال زيادة جاهزية الفسفور و انتاج حامض الاندول استيك اسد (IAA) و زيادة نشاط انزيم الـ Protease.

5: الاستنتاجات والتوصيات

5-1: الاستنتاجات :

1. اظهرت نتائج العزل والتشخيص وجود 53 عزلةً فطرية من فطر *Trichoderma* spp من اصل 100 عينةٍ تربة .
2. اظهر اختبار القدرة التضادية ان11عزلةً فطرية من اصل 53 عزلة للفطر *Trichoderma* spp. قدرة تضادية عالية ضد عدد من الفطريات الممرضة المختلفة مختبريا وحقليا .
3. أظهرت عمليات التشخيص الجزيئي لـ11 عزلة من الفطر *Trichoderma* spp. الموجودة في ترب النباتات السليمة بطريقة تحليل التتابع النيوكليوتيدي للحامض النووي DNA ومقارنتها مع تتابعات العزلات المسجلة في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) بأنها انواع تابعة للفطر *Trichoderma* spp. فكانت عزلة واحدة تابعة لكل نوع من الفطر*Trichoderma* spp. وهي *T. viride* و *T. koningii* و *T. koningiopsis* و *2 عزلة فطرية تابعة لكل نوع من الفطر Trichoderma* spp. هي *T. harzianum* و *T. pseudokoningii* و *4 عزلات تابعة للنوع T.reesei* .
4. فعالية عوامل المكافحة في استحثاث المقاومة الجهازية في النبات وزيادة فعالية انزيمي البيروكسديز(POD) والبولي فينول اوكسديز (PPO) وزيادة محتوى النبات من المركبات الفينولية .
5. كشفت نتائج التحري عن السم الفطري Gliotoxin في رواشح العزلات الفطرية المنتخبة ، وجود السم الفطري ببعض العزلات الفطرية وبتراكيز متباينة بين العزلات الفطرية .
6. وجد أنَّ لإضافة راشح عزلات الفطر *Trichoderma* spp. (YShB4، YShD9 ، YShH7 ، YShM2 ، YShN4) الى الفطريات الممرضة *Fusarium* sp. ، *Pythium* sp. , *Rhizoctonia* sp. و *Sclerotinia* sp. تأثيراً تثبيطياً متبايناً في معدل النمو القطري للفطريات الممرضة.
7. لم يكن لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. المشخصة قدرة تضادية فيما بينها عند اختبارها على وسط البطاطا دكستروز اكار (PDA) في اطباق بتري.

8. التوليفة بين ثلاث عزلات للفطر *Trichoderma spp* أثبت تأثيراً تآزريا في تثبيط عزلات الفطريات الممرضة *(Pythium sp ، Rhizoctonia sp ، Fusarium sp)* *وله* دورٌ معنويٌ في زيادة نسبة الانبات لنبات الخيار .

2-5: التوصيات

1. العمل على إنتاج مستحضر حيوي تجاري من عوامل المكافحة الأحيائية الفطر الأحيائي *Trichoderma* spp. لفاعليتها الكبيرة ضد الفطريات الممرضة والإسهام في تقليل استخدام المبيدات الكيميائية للحد من تلوث البيئة و الاستفادة من عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المعزولة في هذه الدراسة و استخدامها كبديل للمبيدات الكيميائية، اذ اثبتت هذه العزلات امكانية عالية في مكافحة المسببات المرضية .
2. الاعتماد على الطرق الجزيئية الحديثة في تشخيص الفطريات ، لعدم تمكن الطرق التقليدية (التشخيص المظهري) من تشخيص والتمييز بين الأنواع المتقاربة وراثيا .
3. . اجراء المزيد من البحوث حول استخلاص السم الفطري Gliotoxin واستخدامه في المكافحة الاحيائية .
4. أستعمال التوليفة المكونة من عزلات *Trichoderma* spp. المنتجة للسم Gliotoxin الفطري والمركبات المستحثة في مقاومة الفطريات الممرضة .
5. زيادة البحوث حول الفطريات المنتجة للمركبات المستحثة للمقاومة وزيادة فعالية انزيمي البيروكسديز Peroxidase (POD)، و(PPO) البولي فينول اوكسديز وزيادة محتوى النبات من المركبات الفينولية .

6- المصادر

6-1: المصادر العربية

الجبوري، حرية حسين، االاء خضير حسان وياسر ناصر الحميري. (2018) .تأثير بعض المحفزات ألاحيائية في مقاومة نبات الفراولة / الفريز ضد الفطر *Macrophomina phaseolina* (Tassi (Goild المسبب لمرض تعفن الجذور والساق. مجلة وقاية النبات العربية، 36(2)154-.163.

السرحاني امينة إبراهيم ، روابي مرعي المشاري و شذى عبد الحكيم الخليف .(2017) تاثير استعمال الفطر*Trichoderma harizanum* كمسمد حيوي على نمو بادرات الطماطة ، مجلة العلوم الزراعية العراقية 1115_1121 : (4)48.

الأسدي علي عبد علي عودة. (2020). التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر. *Trichoderma spp* وانتاج مبيد حيوي منها وأختبار تأثيره في مكافحة الفطر *Fusarium brachygibbosum* المسبب لتعفن البذور وموت بادرات الطماطة *Solanum lycopersicom L*، رسالة ماجستير جامعة كربلاء . كلية الزراعة قسم وقاية النبات.

الخفاجي سجاد جاسم عبد الحر (2020). عزل وتشخيص بكتريا المسببة لمرض التدرن التاجي على شتلات اليوكالبتوز *Eucalyptus camaldulensis* Dehn ومقاومتها باستخدام بعض العوامل الاحيائية والكيميائية، رسالة ماجستير جامعة كربلاء كلية الزراعة قسم وقاية نبات.

العبيدي، مهند حامد يونس العبيدي (2019). تأثير مستخلصات أوراق أشجار اليوكالبتس *Eucalyptus camaldulensis* في نمو فطريات إعفان جذور شتلات الصنوبر البروتي *Pinus brutia* Ten. والثويا الشرقية *Biota oreintalis* L. من خلال بعض صفات النمو. رسالة ماجستير، كلية الزراعة والغابات ،جامعة الموصل ،العراق .

العامري هديل احمد و زهير عز الدين داؤد و فاتن نوري مال عبد (2018) . عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لشتلات اصناف الشليك ومقاومتها احيائي ا وكيميائيا . مجلة علوم الرافدين ، المجلد27، العدد1، ص82-94 .

الشعبي، صلاح، جورج ملوحي و لينا مطرود (2007). مكافحة مرض سقوط بادرات الطماطة (*Rhizoctonia solani* Kuhn) باستخدام الفطر *Trichoderma koningii* Oudem و المبيدين فلوتولانيل وتولكلوفوس مثيل.مجلة وقاية النبات العربية.25 :15-27.

اللشي ،نجوى بشير (2013) . تأثير بعض أنواع المبيدات الإحيائية الفطرية والبكتيرية في موت بادرات وتعفن جذور الباميا في البيت الزجاجي. مجلة علوم الرافدين .24 (5):ص16-37.

الغانمي علي عبد الكاظم و حيدر حوراء عباس. (2012). تحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا1-3 كلوكانيز من الفطر *Trichoderma fertile* ، journal of kerbala university, 10(3).

الحيدري ،علي عاجل جاسم . 2007 . تشخيص الفطريات المسببة لموت بادرات الباميا و مقاومته بتقنيات مختلفة للفطر *Trichoderma harzianum* Rafai . رسالة ماجستير . كلية - الزراعة – جامعة الكوفة .

بنيان ليلى عبد الرحيم ,و خلف جنان مالك. (2017). تاثير بعض المستخلصات المائية والرواشح الفطرية في بعض جوانب الاداء الحياتي لخنفساء الحبوب الشعرية الخابرا Trogoderma granarium. Misan Journal of Acodemic Studies, 16(32

حسون، أبراهيم خليل .(2005) . المكافحة البيولوجية و الكيمائية لمسبب مرض تقرح ساق البطاطا *Rhizoctonia. solani* kun أطروحة دكتوراه .كلية الزراعة .جامعة بغداد.

حسن عبد الله عبد الكريم و القيسي عبير رووف محمود (2019) مقاومة مرض تعفن جذور الحنطة المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* باستخدام اليات استحثاث المقاومة الجهازية وتقيم كفاءة الاستحثاث في مؤشرات النمو الخضرية والإنتاجية ،شبكة المؤتمرات العربية .

سعيد، فالح حسن. (2015) . الأدارة المتكاملة للألسمدة الكيميائية والعضوية والأحيائية وتأثيرها في نمو وانتاجية بعض التراكيب الوراثية لنبات الخيار. اطروحة دكتوراه، قسم البستنة وهندسة الحدائق، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق. 182 صفحة

سهيل فارس محمد (2013) تاثير التداخل بين التلقيح بفطر الترايكودرما *Trichoderma harzianum* والتسميد النباتي بطحلب *Chara sp.* والكيميائي في نمو نبات البصل Onion (*Allium cepa L.*) ، مجلة ديالى للعلوم الزراعية ، 5 (2) : 223_231.

سعاد منازل. (2011). الفطريات الملوثة لبذور الذرة(Zea mays) والمكافحة البيولوجية للفطر *Fusarium moniliforme*. ، رسالة ماجستير جامعة فرحات عباس سطيف .

عبدالسادة علي جبار ، فالح حسن سعيد، عادل طه أمين ، أسامة عبدالله علوان وهادي مهدي عبود (2012) فعالية الفطرين *Trichoderma harzianum* ، *Trichoderma viride* وتوليفاتهما مع عزلتين من الفطر *Glomus mosseae* في انبات بذور ونمو بادرات الطماطة *Lycopersicon esculentum Mill* مجلة كلية التربية الأساسية عدد (74).

عبيد أحمد غضيب ، و الجنابي جواد كاظم .(2013) .استحثاث المقاومة في نبات الخيار ضد مرض البياض الدقيقي المتسبب عن الفطر *Podosphaera xanthii* باستخدام حامض السالسليك والفطر *Trichoderma harzianum*. مجلة جامعة بابل ، .(4) 21

علاء ناصر احمد ، عماد حميد عبد الصمد العرب و بيداء غازي عوفي (2019) تأثير إضافة السماد السائل والتلقيح بالفطر *Trichoderma harzianum* في صفات النمو لبادرات نخيل التمر . مجلة البصرة لابحاث نخلة التمر ، المجلد 18 العدد (1) .

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

عبود، هادي مهدي، حمود مهدي صالح وفرقد عبد الرحيم الراوي .1989. بعض عوامل المكافحه الاحيائيه كعوامل محفزه لنمو النبات.المجله العراقيه للاحياء المجهريه. العدد الاول 178-181 .

فالح، جنان علي (2021) التشخيص الجزيئي للفطر Rhizoctonia solani المسبب لمرض تعفن بذور وموت بادرات الخيار.(Cucumis sativus L) ومكافحته باستخدام بعض أنواع الفطر .Trichoderma spp واوكسيد الزنك النانوي والمبيد. Rhizolex رسالة ماجستير. كلية الزراعة.جامعة كربلاء ، قسم وقاية نبات .

فرج أزهر حميد ، حسين فاضل خلف و نور كاظم كريم .(2017) .إنتاج Xylanase بواسطة *Trichoderma hamatum* باستخدام قش القمح وقشر الأرز كبديل رخيص .مجلة واسط للعلوم والطب ، .(1) 10

لطيف حيدر (2010) اختبار كفاءة راشح الفطر *Trichoderma harzianum* في المكافحة الحيوية لحشرة خنفساء الحبوب الشعرية الخابرا *Trogoderma granarium* ، مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة المجلد (2) العدد (1) .

مطرود، عبد النبي عبد الامير. (2018). تأثير الفطرينCheatomum globosum و Trichoderma koningiiفي نمو نباتات الطماطة وامراض المجموع الخضري المزروعة في وسط زرعي مفصول .*مجلة الكوفة للعلوم الزراعية Kufa Journal | for Agricultural Science*, *10*(2).

6-2 : References

Aajmi Salman, M., and A Kamal Al-Shibani, J. (2019). Effect the Treatments of Biofertilizer and Mineral Fertilizer on C ontent of NPK of Soil Cultivated with Crop Corn (*Zea Mays L*). Al-Qadisiyah Journal For Agriculture Sciences, 9(2), 247-256.

Afify, A., Abo-El-Seoud, M. A., Ibrahim, G. M., and Kassem, B. W. (2013). Stimulating of biodegradation of Oxamyl pesticide by low dose gamma irradiated fungi. Journal of Plant Pathology and Microbiology, 4(9).

Agrios GN. 2005. Plant pathology San Diego, California 92101-4495. Cambridge, MA: Elsevier Academic Press.

Ahmid, D. H., and Ismail, S. M. (2020, August). Effectiveness evaluation of Trichozone for *Trichoderma harzianum* and Fulzyme for Bacillus subtillus and *Pseudomonas fluorescens* in curbing causes of charcoal rot disease on the watermelon plant. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 553, No. 1, p. 012017). IOP Publishing.

Al-Abedy, A. N.; Al-Janabi, R. G.; Al-Tmeme, Z. A.; Salim, A. T.; and Ashfaq, M. (2020). Molecular characterization of novel isolates of *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma Atroviride* and *Fusarium* spp. isolated from different plants and cutting woods in Iraq. Pakistan Journal of Botany , 52(3), 1073-1082

Al-Esawee, T. A. A. W., and AL-Taae, A. K. M. (2016). Effects of two biological agents *Trichoderma harzianum* and *T. viride* in control of gray mold disease in tomato and eggplant under greenhouse

condition. ANBAR JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES, 14(2).

Alexopoulus, G.J.; Mims, C.W. and Blackman, M. (1996). Introductory Mycology. 4th Ed. 869 pp. John Wiley and Sons. New York..

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

Al-Hamdany, G. (2008). Cellulytic, Pectolytic and Protease Enzymes of the Fungi *Trichoderma pseudokomngii*, *Trichoderma harizianum* and *Gliocladium roseum* Used in Biological Control. Rafidain Journal of Science, 19(4), 94-102.

Aljofan, M., Sganga, M. L., Lo, M. K., Rootes, C. L., Porotto, M., Meyer, A. G., ... and Mungall, B. A. (2009). Antiviral activity of gliotoxin, gentian violet and brilliant green against Nipah and Hendra virus in vitro. Virology Journal, 6(1), 1-13.

Al-Obaidy, O. M. A. (2019). Antimicrobial Activity of Some *Trichoderma* spp. against Different Kinds of Fungal and Bacterial Isolates. JOURNAL OF EDUCATION AND SCIENCE, 28(1), 9-16.

Al-Sanae, E. A. M., Afaf, I., Shehata, A. H., Mohammed, A., and 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., and AL-Abedy, A. N. (2019, November). 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 Environmenta Science (Vol. 388, No. 1, p. 012002). IOP Publishing

Altindag, M., Sahin, M., Esitken, A., Ercisli, S., Guleryuz, M., Donmez, M. F., and Sahin, F. (2006). Biological control of brown rot (Moniliana laxa Ehr.) on apricot (Prunus armeniaca L. cv. Hacıhaliloglu) by Bacillus, Burkholdria, and Pseudomonas application under in vitro and in vivo conditions. Biological Control, 38(3), 369-372.

Alwan, D. S., Al-Kurtany, A. A. E. S., and Al-Zubaide, N. A. J. (2012). Evaluation of efficacy of the biological control fungi *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* in protection black cumin seed and seedling from infection with field funji *Fusarium solani, Fusarium lateritium* and *Rhizoctonia sp*. and effect on some calibrate growth. Diyala Agricultural Sciences Journal, 4(2).

Andhare Aishwarya, A., Shinde Ravindra, S., and Amol, J. (2019). Isolation, identification and characterization of *Trichoderma spp.* as a biocontrol agent against onion black rot.

Axelsson, V. (2006). Evaluation of neurotoxic properties of gliotoxin (Doctoral dissertation, Institutionen för neurokemi).

Aziz, A. Y., Foster, H. A., and Fairhurst, C. P. (1993). Extracellular enzymes of *Trichoderma harzianum, T. polysporum* and

Scytalidium lignicola in relation to biological control of Dutch Elm disease. Arboricultural Journal, 17(2), 159-170

Begum, S. H. E. H. L. A., Iqbal, M. U. D. A. S. S. A. R., Iqbal, Z. A. F. A. R., Shah, H. U., and Numan, M. (2018). Assessment of mycelia extract from *Trichoderma harzianum* for its antifungal, insecticidal and phytotoxic importance. *J Plant Biochem Physiol*, *6*(206), 2.

Bell, D. K., Wells, H. D., and Markham, C. R. (1982). In vitro antagonism of Trichoderma species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, *72*(4), 379-382.

Benitez, T., Rincon, A. M., Limon, M. C., and Codon, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. International microbiology, 7(4), 249-260

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

Bisen, K.; Keswani, C.; Patel, J. S.; Sarma, B. K.; and Singh, H. B. (2016). *Trichoderma* spp.: efficient inducers of systemic resistance in plants. In Microbial-mediated induced systemic resistance in plants (pp. 185-195). Springer, Singapore

Bladock, J. A. and Nelson, P. N. 2000. Soil organic matter. In Sumner, M.E. (Ed). Hand book of Soil science CRC. Press. PP 25 –48.

Bokhari, F. M. (2002). Aflatoxins production by *Aspergillus flavus*, isolated from different food stuffs commonly used in Jeddah

region, Saudi Arabia. Pakistan Journal of Biological Sciences, 5(1), 69-74.

Booth, N. A., Simpson, A. J., Croll, A., Bennett, B., and MacGregor, I. R. (1988). Plasminogen activator inhibitor (PAI- 1) in plasma and platelets. British journal of haematology, 70(3), 327-333.

Carberry, S., Molloy, E., Hammel, S., O'Keeffe, G., Jones, G. W., Kavanagh, K., and Doyle, S. (2012). Gliotoxin effects on fungal growth: mechanisms and exploitation. Fungal Genetics and Biology, 49(4), 302-312.

Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutiérrez, A., Chet, I., and Herrera-Estrella, A. (1999). Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. Applied and Environmental Microbiology, 65(3), 929-935.

Chohan, S., Idrees, S., Abid, M., Perveen, R., and Malik, M. T. (2019). Biological potential of Trichoderma species in the control of some phytopathogenic fungi. Pakistan Journal of Phytopathology, 31(2), 201-206.

Christensen, M. J., Falloon, R. E., and Sklpp, R. A. (1988). A petri plate technique for testing pathogenicity of fungi to seedlings and inducing fungal sporulation. Australasian plant pathology, 17(2), 45-47

Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmino, B. P.; and Simons, A.(1996). Mackin and McCartney Practical Medical Microbiology. The Churchill Livingstone. Inc. USA.

Conrad, J. L., Balcarcel, A. M., and Mehling, C. M. (2012). Earliest example of a giant monitor lizard (Varanus, Varanidae, Squamata). PLoS One, 7(8), e41767

Cruz-Magalhaes, V., Nieto-Jacobo, M. F., van Zijll de Jong, E., Rostas, M., ´ Padilla-Arizmendi, F., Kandula, D., Kandula, J., Hampton, J., HerreraEstrella, A., Steyaert, J. M., Stewart, A., Loguercio, L. L., and MendozaMendoza, A. (2019). The NADPH oxidases Nox1 and Nox2 differentially regulate volatile organic compounds, fungistatic activity, plant growth promotion and nutrient assimilation in *Trichoderma atroviride*. Front. Microbiol. 9:3271.

Das, M. M., Haridas, M., and Sabu, A. (2019). Biological control of black pepper and ginger pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*, using *Trichoderma* spp. Biocatalysis and agricultural biotechnology, 17, 177-183.

de Ita, M. A. V., Lezama, C. P., and Simon, A. B. (2020). In vitro Antagonism of Strains of *Trichoderma spp.*, on Pathogenic Fungi of Nopal Vegetable. J Pure Appl Microbiol, 14(2), 1345-1352.

De Palma, M., Salzano, M., Villano, C., Aversano, R., Lorito, M., Ruocco, M., ... and Tucci, M. (2019). Transcriptome reprogramming, epigenetic modifications and alternative splicing orchestrate the tomato root response to the beneficial fungus *Trichoderma harzianum*. Horticulture research, 6(1), 1-15.

Delacruz, N., Payne, G. F., Smith, J. M., and Coppella, S. J. (1992). Bioprocess development to improve foreign protein production

from recombinant Streptomyces. Biotechnology progress, 8(4), 307-315.

Dewan MM, Abdullah AA, AL-Abedy AN(2019). Growth conditions favorability ofthe common air-born fungus Cladosporium sphaerospermum. Growth, 4: 3 .

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

Diaz-Najera, J. F.; Serna, S. A.; Bahena, A. M.; Cruz, E.B.; Hernandez, M.V.; Gomez, O.G.; Aragón, D.F. (2021). First Report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) Causing Wilt Disease of *Phaseolus vulgaris* in Mexico. Plant Dis.105:710.

Dinel, H., M. Levesque, and G. R. Mehugs. (1991). Effect of long chain aliphatic compounds on the aggregation stability a lacustrine silty clay. Soil Sci. 151:228 – 239.

Dwivedi, S. K., and Prasad, G. (2016). Integrated management of Sclerotium rolfsii: an overview. European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, 3(11), 137-146.

Eken, C., and Demirci, E. (2003). Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and bi nucleate Rhizoctonia anastomosis groups isolated from forage legumes in Erzurum, Turkey. Phytoparasitica , 31(1), 76-80.

Elad, Y., and Kapat, A. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of Botrytis cinerea. European Journal of plant pathology, 105(2), 177-189.

Emmerich, W. E., Lund, L. J., Page, A. L., and Chang, A. C. (1982). Solid phase forms of heavy metals in sewage sludge-treated soils (Vol. 11, No. 2, pp. 178-181). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.

Etzel, R. A. (2002). CONTEMPO UPDATES.

Eugenia Renteria-Martínez, M.; Angel Guerra-Camacho, M.; Ochoa-Meza, A.; Francisco Moreno-Salazar, S.; del Carmen Meza-Moller, A.; and Manuel Guzman-Ortiz, J. (2019). Description and comparison among morphotypes of *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* pathogenic to watermelon in Sonora, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatologia, 37(1).

Flores, M., Grimm, C. C., Toldrá, F., and Spanier, A. M. (1997). Correlations of sensory and volatile compounds of Spanish "Serrano" dry-cured ham as a function of two processing times. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(6), 2178-2186.

Foda.M.FandLoizou,I.K.(2019). Viruses Infecting the Plant Pathogenic Fungus Rhizoctonia solani.www.mdp.com/journal/Viruses.

Gajera, H.P, R.P. Bambharolia, S.V. Patel, T.J. Khatrani and B.A. Goalkiya.(2012). Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Macrophominia phaseolina*: evaluation of coiling and cell wall degrading enzymatic activities. Journal of Plant Pathology and Microbiology, 3: 27-32

Baker, K. F., and Cook, R. J. (1974). Biological control of plant pathogens. WH Freeman and Company

Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Omidvar, R., and Kariman, K. (2018). Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. Biological Control, 117, 147-157.

Gomez - Vasquez, R. O. C. I. O., Day, R., Buschmann, H., Randles, S., Beeching, J. R., and Cooper, R. M. (2004). Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor- challenged cassava (Manihot esculenta) suspension cells and leaves. Annals of botany, 94(1), 87-97.

Guzman-Guzman, P., Porras-Troncoso, M. D., Olmedo-Monfil, V., and Herrera-Estrella, A. (2019). Trichoderma species: versatile plant symbionts. Phytopathology, 109(1), 6-16.

Hammerschmidt, R., and Kuc, J. (1982). Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. Physiological Plant Pathology, 20(1), 61-71.

Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A., and Chet, I. (1996). Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. Phytopathology, 86(9), 980-985.

Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology, 96(2), 190-194.

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

Hinterdobler, W., Li, G., Spiegel, K., Basyouni-Khamis, S., Gorfer, M., and Schmoll, M. (2021). *Trichoderma reesei* isolated from Austrian soil with high potential for biotechnological application. Frontiers in microbiology, 12, 105.

Houssien Kamal Nofal, M. F. A. (2010). Influence of age, gender, and prodromal symptoms on sudden death in a tertiary care hospital, eastern Saudi Arabia. Journal of Family and Community Medicine, 17(2), 83.

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

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

https://www.mycobank.org

IAS, International Allelopathy society constitution, (1996). First world congress on Allelopathy. Ascience for the Kh future, September, Cadis, Spain. Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd Ed. APS Press, St.

Inovejas, R. C., and Divina, C. C. (2018). Methanol extract and nanocomposite of *Trichoderma* sp. as a potential bio-control against *Fusarium moniliforme* in tomato (Lycopersicon esculentum). Int J Agric Technol, 14, 99-108.

Isabel, M.;Roncero, G.; Antonio, D.; Carmen ,R. M.; Dolores ,H.G.M.; Garcia- Maceira, F.I. Emesa , M., Angles ,C.; Rocio ,S.Z.;Conch .H.;.(2000).Role of cell wall degrading enzymes in pathogenicity of *Fusarium oxysporium*.Rev.Iberoam Micol.,17 ; 547-553.

JACKSON, C. E. (1958). Hereditary hyperparathyroidism associated with recurrent pancreatitis. Annals of internal medicine, 49(4), 829-836.

Jakopic, J., and Veberic, R. (2009). Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. Acta Agriculturae Slovenica, 93(1), 11.

Kaewchai, S. (2009). Mycofungicides and fungal biofertilizers. Fungal Divers, 38, 25-50

Kareem, H. J., and Al-Araji, A. M. (2017). Evaluation of *Trichoderma harzianum* biological control against *Fusarium oxysporum* f. sp. melongenae. Iraqi Journal of Science, 58(4B), 2051-2060.

Kareem, T. A. and Hassan, M. S. (2013). Molecular characterization of.*Rhizoctonia solani* isolated from pepper plants in Iraq by using PCR. Diyala Agricultural Sciences Journal, 5(2): 45-54.

Kavanagh, K. D. (2005). Boom-or-bust growth in coral reef lagoons. Marine Ecology Progress Series, 286, 307-310.

Khalili, E., Javed, M. A., Huyop, F., Rayatpanah, S., Jamshidi, S., and Wahab, R. A. (2016). Evaluation of Trichoderma isolates as potential biological control agent against soybean charcoal rot

disease caused by *Macrophomina phaseolina*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *30*(3), 479-488.

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.

Konda, P. V. (2018). Magellan: Toward building entity matching management systems. The University of Wisconsin-Madison.

Kubicek, C. P., and Harman, G. E. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor and Francis Ltd.

Kuguk, C., and Kivang, M. (2002). Isolation of *Trichoderma* spp and determination of their antifungal, biochemical and physiological featurd. Turky. J. Biol, 27, 247-253.

Kumar, A., Azad, C. S., Kumar, R., and Imran, M. (2017). *Trichoderma*: A potential biocontrol agent for plant disease management. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. SP1, 511-512.

Leslie, J. F., and Summerell, B. A. (2006). Fusarium laboratory workshops—a recent history. Mycotoxin Research, 22(2), 73-74.

Li, M. F., Li, G. H., and Zhang, K. Q. (2019). Non-volatile metabolites from *Trichoderma spp*. Metabolites, 9(3), 58.

Lopez, A. C., Alvarenga, A. E., Vereschuk, M. L., Barua, R. C., Zapata, P. D., Luna, M. F., and Villaba, L. L. (2020). *Trichoderma* strains isolated from Ilex paraguariensis ST. HIL:

promising biocontrol agents with chitinolytic activity and plant growth promoter on Lycopersicum esculentum. Arab Journal of Basic and Applied Sciences, 27(1), 105-113

Lozovaya, V. V., Lygin, A. V., Zernova, O. V., Li, S., Widholm, J. M., and Hartman, G. L. (2006). Lignin degradation by *Fusarium solani f.* sp. glycines. Plant Disease, 90(1), 77-82.

Lucking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Ariyawansa, H. A., Aoki, T., ... and Schoch, C. L. (2020). Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?. IMA fungus, 11(1), 1-32.

Mahde, B. Y., Fayyadh, M. A., and Al-Luaibi, S. S. (2019). Evaluation of Biofungicide Formulation of *Trichoderma longibrachiatum* in Controlling of Tomato Seedling Damping-off Caused by *Rhizoctonia solani*. Basrah J. Agric. Sci., 32(2), 135-149.

Majdinasab, M., Ben Aissa, S., and Marty, J. L. (2021). Advances in Colorimetric Strategies for Mycotoxins Detection: Toward Rapid Industrial Monitoring. Toxins, 13(1), 13.

Markovich, N. A., and Kononova, G. L. (2003). Lytic enzymes of Trichoderma and their role in plant defense from fungal diseases: a review. Applied Biochemistry and Microbiology, 39(4), 341-351.

Matrood, A. A., and Al-Taie, A. H. (2017). Inhibition Activity of mycorrhizal Fungi Glomus mosseae and G. intradicas with *Trichderma harizanum* Against *Rhizoctonia solani* in Okra Plant Abelmoschus esculentus (L.). Basrah J. Agric. Sci., 30(2), 72-82.

McKinney, H. H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by Helminthosporium sativum.

Misra, V., and Ansari, M. I. (2021). Role of Trichoderma in Agriculture and Disease Management. Plant Growth-Promoting Microbes for Sustainable Biotic and Abiotic Stress Management, 425-440.

Mohamed, B. F.; Sallam, N. M.; Alamri, S. A.; Abo-Elyousr, K. A.; Mostafa, Y. S.; and 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

Montealegre, J.; Valderrama, L.; Sanchez, S.; Herrera, R.;Besoain, X.; and Pérez, L. M. (2010). Biological control of *Rhizoctonia solani* in tomatoes with *Trichoderma harzianum* mutants. Electronic Journal of Biotechnology, 13(2), 1-2.

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mukherjee, M., and Schmoll, M. (2013). Trichoderma: biology and applications. CAB. International, Wallingford, https://doi. org/10.1079/9781780642475.0000.

Nayaka, S. C., Shankar, A. C. G. U., Niranjana, S. R., and 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.

NOSIR, W. (2019). NOVEL ROLE OF 6-N-PENTYL-6H-PYRAN-2-ONE PRODUCED BY *Trichoderma harzianum* IN HYDROPONIC SYSTEM. The Future of Biology, (2).

Ogoshi, A. (1996). Introduction—the genus Rhizoctonia. In Rhizoctonia species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control (pp. 1-9). Springer, Dordrecht.

Ojha, S., and Chatterjee, N. C. (2012). Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum f.* sp. lycopersici mediated through salicylic acid and *Trichoderma harzianum*. Journal of plant protection research, 52(2).

Oliveira, M. D. M., Varanda, C. M. R., and Felix, M. R. F. (2016). Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. Phytochemistry letters, 15, 152-158.

Osiewacz, H. D. (Ed.). (2002). Molecular biology of fungal development (Vol. 15). CRC Press.

Pakora, G. A., Mpika, J., Kone, D., Ducamp, M., Kebe, I., Nay, B., and Buisson, D. (2018). Inhibition of Phytophthora species, agents of cocoa black pod disease, by secondary metabolites of *Trichoderma* species. Environmental Science and Pollution Research, 25(30), 29901-29909.

Pandian,R.T.: Kumar,R.J.A.A. and SH,P.(2016). Morphological and molecular characterization of *Trichoderma asperellum* strain Ta13. Indian Phytopath. 69 (3) : 298-303.

Paudel, V., Pathak, R., Lamichhane, J., and Gauchan, D. P. (2017). Biocontrol and growth enhancement potential of *Trichoderma* spp. on broad leaf mustard. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology, 13(1), 85-94.

Pimentel, M. F., Arnao, E., Warner, A. J., Subedi, A., Rocha, L. F., Srour, A., ... and Fakhoury, A. M. (2020). *Trichoderma* isolates inhibit *Fusarium virguliforme* growth, reduce root rot, and induce defense-related genes on soybean seedlings. Plant disease, 104(7), 1949-1959

Poosapati, S., Ravulapalli, P.D.,Tippirishetty, N., Vishwanathaswamy, D. K., and Chunduri, S. (2014). Selection of high temperature and salinity tolerant Trichoderma isolates with antagonistic activity against Sclerotium rolfsii. SpringerPlus, 3(1), 641.

Puckhaber, L. S., Dowd, M. K., Stipanovic, R. D., and Howell, C. R. (2002). Toxicity of (+)-and (−)-gossypol to the plant pathogen, *Rhizoctonia solani*. Journal of agricultural and food chemistry, 50(24), 7017-7021.

Punja, Z. K.; Scott, C.; and Chen, S. (2018). Root and crown rot pathogens causing wilt symptoms on field-grown marijuana (Cannabis sativa L.) plants. Canadian journal of plant pathology, 40(4), 528-541.

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.

Richard, J. L., and DeBey, M. C. (1995). Production of gliotoxin during the pathogenic state in turkey poults by Aspergillus fumigatus Fresenius. Mycopathologia, 129(2), 111-115.

Rifai, M.A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma common*. Mycol. Inst. Mycol., 116: 1-56.

Ruangwong, O. U., Wonglom, P., Suwannarach, N., Kumla, J., Thaochan, N., Chomnunti, P., ... and Sunpapao, A. (2021). Volatile Organic Compound from *Trichoderma asperelloides* TSU1: Impact on Plant Pathogenic Fungi. Journal of Fungi, 7(3), 187.

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

Sadasivam, S., and Manickam, A. (1992). Biochemical methods for agricultural sciences. Wiley eastern limited.

Sadhasivam, S., Britzi, M., Zakin, V., Kostyukovsky, M., Trostanetsky, A., Quinn, E., and Sionov, E. (2017). Rapid detection and identification of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in stored wheat grain. Toxins, 9(10), 302 .

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

Samson, R. A., Seifert, K. A., Kuijpers, A. F., Houbraken, J. A. M. P., and Frisvad, J. C. (2004). Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus Penicillium using partial β-tubulin sequences. Stud Mycol, 49(1), 175-200.

Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. (2001). Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria (No. Ed. 3). American Phytopathological Society (APS Press).

Scharf, D. H., Brakhage, A. A., and Mukherjee, P. K. (2016). Gliotoxin–bane or boon?. Environmental microbiology, 18(4), 1096-1109.

Schuster, A., and Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of Trichoderma. Applied microbiology and biotechnology, 87(3), 787-799.

Shan L.Y.; Cui W.Y., Zhang D.D., Zhang J., Ma N.N., Bao Y.M., Dai X.F. and Guo W. (2017). First report of *Fusarium brachygibbosum* causing maize stalk rot in China. Plant Disease 101(5), 837

Shoresh, M., Harman, G. E., and Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Annual review of phytopathology, 48, 21-43.

Shrestha, R. (2019). Evaluation Of *Trichoderma Harzianum* As A Biocontrol Agent On *Fusarium Wilt* Of Tomato Grown In Eastern Nepal (Doctoral dissertation, Department of Microbiology, Central Campus of Technology, Tribhuvan University, Dharan, Nepal, in Partial Fulfillment of the Requirements for the Award of Degree of Master of Science in Microbiology).p:1-79

Shresti, A. R. (2005). Studies on Collar Rot Complex of Coleus forskohlii (wild.) Briq (Doctoral dissertation, UAS, Dharwad).

Silletti, S., Di Stasio, E., Van Oosten, M. J., Ventorino, V., Pepe, O., Napolitano, M., ... and Maggio, A. (2021). Biostimulant Activity of Azotobacter chroococcum and *Trichoderma harzianum* in Durum Wheat under Water and Nitrogen Deficiency. Agronomy, 11(2), 380.

Silva, M. R. B. L. D. (2019). Gliotoxin and Bis-methyl-glitoxin production by *Trichoderma* spp. as biocontrol agents running title: human risk potential by using *Trichoderma* spp. metabolites (Doctoral dissertation)

Silvia, M. (2021, July). Application of Trichoderma as an Alternative to the use of Sulfuric Acid Pesticides in the Control of Diplodia Disease on Pomelo Citrus. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 819, No. 1, p. 012007). IOP Publishing.

Singh, A., Shukla, N., Kabadwal, B. C., Tewari, A. K., and Kumar, J. (2018). Review on plant-Trichoderma-pathogen interaction. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci, 7, 2382-2397.

Singh, A.; Shahid, M.; Srivastava, M.; Pandey, S.; Sharma, A.; and Kumar, V. (2014). Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. Virology and Mycology, 3(1), 127-134.

Singh, P.; Singh, J.; Rajput, R. S.; Vaishnav, A.; Ray, S.; Singh, R. K.; and Singh, H. B. (2019). Exploration of multitrait antagonistic microbes against *Fusarium oxysporum f.* sp. lycopersici. Journal of Applied and Natural Science, 11(2), 503-510

Singleton, V. L., and Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American journal of Enology and Viticulture, 16(3), 144-158.

Sivan, A., and Chet, I. (1989). Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. Microbiology, 135(3), 675-682.

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

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.

Stepien, L., and CheLkowski, J. (2010). Fusarium head blight of wheat: pathogenic species and their mycotoxins. World Mycotoxin Journal, 3(2), 107-119.

Sulaiman, E. D., and Youns, A. N. (2019). Study the Mechanisms of Parasitism and Antagonism of Different Biocontrol Agents Against *Sclerotinia sclerotiorum*, the Causal Organism of White Rot Disease on Eggplant in the Laboratory. Tikrit Journal for Agricultural Sciences , 18(1), 47-56.

Suleiman, S. A., Gambo, S. M., and Sunusi, M. (2019). An In Vitro Antagonistic Effect of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum f.* sp. lycopersici. *FUDMA JOURNAL OF SCIENCES-ISSN: 2616-1370*, *3*(1), 369-374.

Sumida, C. H., Daniel, J. F., Araujod, A. P. C., Peitl, D. C., Abreu, L. M., Dekker, R. F., and Canteri, M. G. (2018). *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. Biocontrol science and technology, 28(2), 142-156.

Szengyel, Z., Zacchi, G., Varga, A., and Réczey, K. (2000). Cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C 30 using steam-pretreated spruce. Applied biochemistry and biotechnology, 84(1), 679-691.

Tomah, A. A., Abd Alamer, I. S., Li, B., and Zhang, J. Z. (2020). A new species of Trichoderma and gliotoxin role: A new observation in enhancing biocontrol potential of T. virens against Phytophthora capsici on chili pepper. Biological Control, 145, 104261

Van Coller G.J(2013). Screening of South African wheat cultivars for resistance to *Fusarium* Head Blight (FHB). Report on the production year report to winter cereal trust.

Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., and Valero, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal, 37(1), 1-20.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Woo, S. L., Nigro, M., Marra, R., ... and Lorito, M. (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. The Open Mycology Journal, 8(1).

Vinale, F.; Ghisalberti, E. L.; Sivasithamparam, K.; Marra, R., Ritieni, A.; Ferracane, R., ... and 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.

Vitti, A., Pellegrini, E., Nali, C., Lovelli, S., Sofo, A., Valerio, M., and Nuzzaci, M. (2016). *Trichoderma harzianum* T-22 induces systemic resistance in tomato infected by Cucumber mosaic virus. Frontiers in plant science, 7, 1520.

Wang, K. D., Borrego, E. J., Kenerley, C. M., and Kolomiets, M. V. (2020). Oxylipins other than jasmonic acid are xylem-resident signals regulating systemic resistance induced by *Trichoderma virens* in maize. The Plant Cell, 32(1), 166-185.

Waring, P., and Beaver, J. (1996). Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines. General Pharmacology: The Vascular System, 27(8), 1311-1316.

Weindling, R., and Emerson, O. H. (1936). The isolation of a toxic substance from the culture nitrate of. *Trichoderma*, Phytopath, 26, 1068-1074.

Wiranata, A., and Tantiani, D. (2021, July). Potential of Paenibacillus polymyxa bacteria and *Trichoderma* sp. as biological pesticides to control maize leaf blight (*Zea mays L*). In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 800, No. 1, p. 012027). IOP Publishing.

Woo, S. R., Fuertes, M. B., Corrales, L., Spranger, S., Furdyna, M. J., Leung, M. Y., ... and Gajewski, T. F. (2014). STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. Immunity, 41(5), 830-842.

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

Zewain, Q. K., Hassan, K. A., and Ali, S. F. (2019). Comparative performance of several novel organic formulations against root knot nematode Meloidogyne spp. on eggplant crop under greenhouse condition. Research on Crops, 20(4), 802-808.

Zhang, S., Xu, B., Zhang, J., and Gan, Y. (2018). Identification of the antifungal activity of *Trichoderma longibrachiatum* T6 and assessment of bioactive substances in controlling phytopathgens. Pesticide biochemistry and physiology, 147, 59-66.

7: الملاحق

ملحق (1): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma viride isolate Y.N.135.shahad* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Trichoderma viride isolate Y.N.135.shahad. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ970839.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       MZ970839                1647 bp    DNA     linear   PLN
05-SEP-2021
DEFINITION  Trichoderma viride isolate Y.N.135.shahad. small subunit
ribosomal
            RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   MZ970839
VERSION     MZ970839.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma viride
  ORGANISM  Trichoderma viride
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1647)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Molecular diagnosis of Trichoderma spp in iraq
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1647)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (31-AUG-2021) faculty of Agriculture - Plant
Protection,
            University of Kerbala, city center, kerbala, kerbala
KK13DR, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy
sequencing##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1647
                     /organism="Trichoderma viride"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.135.shahad."
                     /db_xref="taxon:5547"
     rRNA            <1..>1647
                     /product="small subunit ribosomal RNA"
```

ملحق (2): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma reesei isolate Y.N.136.shahad* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Trichoderma reesei isolate Y.N.136.shahad. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ970838.1

FASTA Graphics

```
LOCUS       MZ970838                1660 bp    DNA     linear   PLN
05-SEP-2021
DEFINITION  Trichoderma reesei isolate Y.N.136.shahad. small subunit
ribosomal
            RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   MZ970838
VERSION     MZ970838.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)
  ORGANISM  Trichoderma reesei
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales;
Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1660)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Molecular diagnosis of Trichoderma spp in iraq
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1660)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (31-AUG-2021) faculty of Agriculture - Plant
Protection,
            University of Kerbala, city center, kerbala, kerbala
KK13DR, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1660
                     /organism="Trichoderma reesei"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.136.shahad."
                     /db_xref="taxon:51453"
     rRNA            <1..>1660
                     /product="small subunit ribosomal RNA" ORIGIN
```

ملحق (3): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma harzianum isolate Y.N.137.shahad* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Trichoderma harzianum isolate Y.N.137.shahad. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ970767.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       MZ970767                1649 bp    DNA     linear   PLN
05-SEP-2021
DEFINITION  Trichoderma harzianum isolate Y.N.137.shahad. small
subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   MZ970767
VERSION     MZ970767.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma harzianum
  ORGANISM  Trichoderma harzianum
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales;
Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1649)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Molecular diagnosis of Trichoderma spp in iraq
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1649)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (31-AUG-2021) faculty of Agriculture - Plant
Protection,
            University of Kerbala, city center, kerbala, kerbala
KK13DR, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1649
                     /organism="Trichoderma harzianum"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.137.shahad."
                     /db_xref="taxon:5544"
     rRNA            <1..>1649/product="small subunit ribosomal RNA" ORIGIN
```

ملحق (4): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma koningii isolate Y.N.138.Shahad* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Trichoderma koningii isolate Y.N.138.Shahad. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ851984.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       MZ851984 2369 bp DNA    linear   PLN 25-AUG-2021
DEFINITION  Trichoderma koningii isolate Y.N.138.Shahad, small
subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence; internal
transcribed spacer
            1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed
spacer 2,
            complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene,
partial
            sequence.
ACCESSION   MZ851984
VERSION     MZ851984.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma koningii
  ORGANISM  Trichoderma koningii
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales;
Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2369)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Molecular diagnosis of Trichoderma spp in iraq
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 2369)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (20-AUG-2021) faculty of Agriculture - Plant
Protection,
            University of Kerbala, city center, kerbala, kerbala
KK13DR, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
```

```
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2369
                     /organism="Trichoderma koningii"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.138.Shahad."
                     /db_xref="taxon:97093"
     misc RNA        <1..>2369
                     /note="contains small subunit ribosomal RNA,
internal
                     transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA,
internal
                     transcribed spacer 2, and large subunit
ribosomal RNA"
ORIGIN
```

ملحق (5): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma pseudokoningii isolate Y.N.139.shahad.* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Trichoderma pseudokoningii isolate Y.N.139.shahad. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ970709.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       MZ970709                1653 bp    DNA     linear   PLN
05-SEP-2021
DEFINITION  Trichoderma pseudokoningii isolate Y.N.139.shahad small
subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   MZ970709
VERSION     MZ970709.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma pseudokoningii
  ORGANISM  Trichoderma pseudokoningii
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales;
Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1653)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Molecular diagnosis of Trichoderma spp in iraq
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1653)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (31-AUG-2021) faculty of Agriculture - Plant
Protection,
            University of Kerbala, city center, kerbala, kerbala
KK13DR, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1653
                     /organism="Trichoderma pseudokoningii"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.139.shahad."
                     /db_xref="taxon:317029"
     rRNA            <1..>1653/product="small subunit ribosomal RNA" ORIG
```

ملحق (6): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma pseudokoningii isolate* Y.N.140.shahad في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Trichoderma pseudokoningii isolate Y.N.140.shahad. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ927764.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       MZ927764                1651 bp    DNA     linear   PLN
31-AUG-2021
DEFINITION  Trichoderma pseudokoningii isolate Y.N.140.shahad. small
subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   MZ927764
VERSION     MZ927764.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma pseudokoningii
  ORGANISM  Trichoderma pseudokoningii
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales;
Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1651)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Molecular diagnosis of Trichoderma spp in iraq
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1651)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (26-AUG-2021) faculty of Agriculture - Plant
Protection,
            University of Kerbala, city center, kerbala, kerbala
KK13DR, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1651
                     /organism="Trichoderma pseudokoningii"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.140.shahad."
                     /db_xref="taxon:317029"
     rRNA            <1..>1651/product="small subunit ribosomal RNA" ORIGIN
```

ملحق (7): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma reesei isolate Y.N.141.shahad* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Trichoderma reesei isolate Y.N.141.shahad. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ970710.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       MZ970710                1653 bp    DNA     linear   PLN
05-SEP-2021
DEFINITION  Trichoderma reesei isolate Y.N.141.shahad small subunit
ribosomal
            RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   MZ970710
VERSION     MZ970710.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)
  ORGANISM  Trichoderma reesei
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales;
Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1653)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Molecular diagnosis of Trichoderma spp in iraq
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1653)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (31-AUG-2021) faculty of Agriculture - Plant
Protection,
            University of Kerbala, city center, kerbala, kerbala
KK13DR, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1653
                     /organism="Trichoderma reesei"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.141.shahad."
                     /db_xref="taxon:51453"
     rRNA            <1..>1653/product="small subunit ribosomal RNA" ORIGIN
```

ملحق (8): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma koningiopsis isolate Y.N.142.shahad* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Trichoderma koningiopsis isolate Y.N.142.shahad. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ994499.1

FASTA Graphics

```
LOCUS       MZ994499                2369 bp    DNA     linear   PLN
07-SEP-2021
DEFINITION  Trichoderma koningiopsis isolate Y.N.142.shahad. small
subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence; internal
transcribed spacer
            1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed
spacer 2,
            complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene,
partial
            sequence.
ACCESSION   MZ994499
VERSION     MZ994499.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma koningiopsis
  ORGANISM  Trichoderma koningiopsis
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales;
Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2369)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Molecular diagnosis of Trichoderma spp in iraq
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 2369)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (31-AUG-2021) faculty of Agriculture - Plant
Protection,
            University of Kerbala, city center, kerbala, kerbala
KK13DR, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
```

```
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2369
                     /organism="Trichoderma koningiopsis"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.142.shahad."
                     /db_xref="taxon:337941"
     misc RNA        <1..>2369
                     /note="contains small subunit ribosomal RNA,
internal
                     transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA,
internal
                     transcribed spacer 2, and large subunit
ribosomal RNA"
ORIGIN
```

ملحق (9): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma harzianum isolate Y.N.143.shahad* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Trichoderma harzianum isolate Y.N.143.shahad. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ853739.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       MZ853739                1649 bp    DNA     linear   PLN
26-AUG-2021
DEFINITION  Trichoderma harzianum isolate Y.N.143.shahad. small
subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   MZ853739
VERSION     MZ853739.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma harzianum
  ORGANISM  Trichoderma harzianum
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales;
Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1649)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Molecular diagnosis of Trichoderma spp in iraq
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1649)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (21-AUG-2021) faculty of Agriculture - Plant
Protection,
            University of Kerbala, city center, kerbala, kerbala
KK13DR, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1649
                     /organism="Trichoderma harzianum"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.143.shahad."
                     /db_xref="taxon:5544"
     rRNA            <1..>1649/product="small subunit ribosomal RNA" ORIGIN
```

ملحق (10): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma reesei isolate Y.N.144.shahad.* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Trichoderma reesei isolate Y.N.144.shahad. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ970711.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       MZ970711                1651 bp    DNA     linear   PLN
05-SEP-2021
DEFINITION  Trichoderma reesei isolate Y.N.144.shahad. small subunit
ribosomal
            RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   MZ970711
VERSION     MZ970711.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)
  ORGANISM  Trichoderma reesei
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales;
Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1651)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Molecular diagnosis of Trichoderma spp in iraq
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1651)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (31-AUG-2021) faculty of Agriculture - Plant
Protection,
            University of Kerbala, city center, kerbala, kerbala
KK13DR, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1651
                     /organism="Trichoderma reesei"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.144.shahad."
                     /db_xref="taxon:51453"
     rRNA            <1..>1651/product="small subunit ribosomal RNA" ORIGIN
```

ملحق (11): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma reesei isolate Y.N.145.shahad.* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Trichoderma reesei isolate Y.N.145.shahad. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OK078029.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       OK078029                1649 bp    DNA     linear   PLN
14-SEP-2021
DEFINITION  Trichoderma reesei isolate Y.N.145.shahad. small subunit
ribosomal
            RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   OK078029
VERSION     OK078029.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)
  ORGANISM  Trichoderma reesei
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales;
Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1649)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Molecular diagnosis of Trichoderma spp in iraq
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1649)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (31-AUG-2021) faculty of Agriculture - Plant
Protection,
            University of Kerbala, city center, kerbala, kerbala
KK13DR, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1649
                     /organism="Trichoderma reesei"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.145.shahad."
                     /db_xref="taxon:51453"
     rRNA            <1..>1649/product="small subunit ribosomal RNA" ORIGIN
```

Abstract

The study aimed to isolate and partially diagnose the *Trichoderma spp* fungus from soil samples in contact with the healthy plants' root to test its ability to produce the Gliotoxin. In addition, to evaluate its role in stimulating the systematic resistance to treat various plant pathogens. The samples were collected from different Iraqi cities Karbala, Babylon, Diwaniya, Baghdad, Nasiriyah, Najaf, Kirkuk, Mosul, Kut, and Dyala. All the study experiments were done in the Department of Plant Protection/College of Agriculture/ University of Karbala during the agricultural season of 2020-2021 .

The result showed that all the infected samples (*Fusarium sp, Sclerotinia sp, Rhizoctonia sp, and Pythium sp*) that were tested in our lab have a significant reduction in the germination rate of Cabbage seeds (16.6 – 46.66%) compared to the standard rate (93.33%).

The antagonistic ability tests of 53 *Trichoderma spp* samples using a PDA culture medium showed that 11 selective samples had high antagonistic efficiency with a significant difference compared to the control treatment (inhibition rate: 88.88 - 74.07%). However, the sample T.H6 was the least antagonistic (inhibition rate: 22.22%). In plastic pots, the 11 selected samples showed a high antagonistic ability against the pathogenic fungi (*Fusarium sp, Rhizoctonia sp, and Pythium sp*), where the percentage of seedling death was in the range of 25.00 - 35.71% compared to the control treatment (a single treated fungus) 93.33%.

The results of the molecular diagnosis test of 11 selected samples of the *Trichoderma spp* By analyzing the nucleotide sequences, and comparing them using the (Basic Local Alignment Search Tool) (BLAST) program, all mushroom isolates were genetically different with isolates of these same species registered in the International Center for Biotechnology Information, (NCBI). also showed that it is subordinate to the species (YShB4), *T.viride* (YShB10, YShN9, YShR15, YShK8) *T.reesei*, (YShD7, YShN9) *T. harzianum* , (YShD9)*T. koningii*, (YShH7 , YShH8) *T. pseudokonhii*, (YShM2) *T. koningiopsis* .Therefore, it was registered in the names of researchers and under specific entry numbers .

The results also demonstrated that the filtrate 11 samples of the *Trichoderma spp* have different effects on the growth inhibition of pathogenic fungi (*Fusarium sp*, *Rhizoctonia sp*, *Pythium sp*). The result showed a high antagonistic efficiency with a 71.92 - 21.51% inhibition rate compared to the control (0.00%). In addition, the detection test using HPLC technology showed the ability of the fungal samples to produce the mycotoxin gliotoxin. Accordingly, T.B4, T.D9, T.H7, T.N4, and T.M2 were able to produce the mycotoxin gliotoxin, the highest concentration at T N4 was 132.8 µg /g, and the lowest concentration at T.D9 was (76.92 µg /g).

The selected samples (11) were also showed the ability to induce systemic resistance in plants against pathogens by increasing the activity of the following enzymes: polyphenol oxidase, PPO, and peroxidase POD, in addition, to increase the total content of Phenols. Also, the antibiotic test for Trichoderma spp samples (*T.B4, T.D9, T.H7, T.N4, T.M2*) showed no antibiotic activity between the fungal samples (*T.B4, T.N4, T.M2*), while the two samples (*T.D9, T.H7*) showed antibiotics activity between them .

An experimental field test was used to evaluate the role of the combination between the fungal samples (*T.B4, T.N4, T.M2*) that produce mycotoxin Gliotoxin and the inducing compounds of plant pathogens control. The result showed that using the Trichoderma spp subtypes alone can inhibit the disease rate (60.00_33.33%). Moreover, the percentage of the disease reduced significantly when more than one of the samples overlapped compared to the control (0.00%). A 100% inhibition was achieved for two groups of samples of *Trichodema spp* (*N4 T. + T. B4*), (*N4 T. + T. M2*), (*M2 T. + T. B4*) and (*T. M2 + T.B4 + T.N4*).

The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Kerbala
College of Agriculture
Plant Protection Deptarment

Molecular diagnosis of some isolates of *Trichoderma* spp. Isolated from the governorates of Iraq producing the mycotoxin Gliotoxin and evaluating its effectiveness against some pathogens of cucumber plant diseases.

by
Shahad Ali Mohammed Al Bahrani

A thesis
Submitted to the council of the college of Agriculture at the University of Kerbala in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of science in Agriculture / Plant Protection

Supervised by
Ass.Prof.Dr. Yasir Naser Alhamiri

2021 A.D 1443 A.H