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

# دراسة العلاقة بين مستوى انتاج الـ Trichodermin ومقدرة الفطر *Trichoderma* sp على مقاومة مسببات موت بادرات نبات الباميا وتأثير منظمات النمو عليها

رسالة مقدمة الى
مجلس كلية الزراعة - جامعة كربلاء
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير
في العلوم الزراعية - وقاية النبات

من قبل

سعد احمد علوان الطائي

بأشراف

أ.م.د. ياسر ناصر حسين الحميري

1443هـ 2021 م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ
أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة المجادلة: الآية 11

# إهداء

الى سيد الخلق ،،،

نبي الرحمة وخاتم الأنبياء الحبيب محمد ( صلى الله عليه وآله وسلم )

الى وطن العلم والعلماء

ووطن الاولياء والأوصياء .....وطني العراق

الى كنوز العلم الثمينة

ومن اقتبس منهم العلم ونبراس المعرفة .....أساتذتي الأفاضل

الى ينبوع الحنان و قمرا أضاء ظلام عقلي

أمي الغالية

الى مدرستي ألأولى في الحياة واحمل اسمة فخراً

والدي العزيز

الى الغيوم التي استضل بها

والانهار التي ارتوي منها ..... أخوتي وأخواتي

الباحث

# شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على خاتم النبين محمد (صلى الله عليه وآله وسلم) الحمد لله على ما كان ونستعين به على ما يكون ونسأله المعافاة في الاديان كما نسأله المعافاة في الأبدان .

اتقدم بالشكر الجزيل والثناء الجميل الى الاستاذ المشرف الدكتور ياسر ناصر حسين الحميري لما قدم من جهود في التوجيه والإرشاد والمعلومات القيمة التي اسهمت في اثراء موضوع دراستنا في جوانبها المختلفة فجزاه الله خيرا ونسال الله له التوفيق و دوام الصحة والعافية.

اتقدم بالشكر الجزيل الى عمادة كلية الزراعة متمثلة بعميدها الدكتور ثامر كريم خضير الجنابي وكافة منتسبيها لما قدموه من تسهيلات لإتمام الرسالة وأتقدم بخالص الشكر لقسم وقاية النبات جميع التدريسين والمنتسبين لما قدموه من مساعدة ودعم خلال فترة الدراسة .

كما اتقدم بالشكر الجزيل الى الاستاذ الدكتور عباس العامري (قسم المحاصيل الحقلية ) لمساعدة في اتمام العمل .

كما اتقدم بالشكر الجزيل لدكتور عدنان عبد الجليل لهوف والدكتور مشتاق طالب و الاستاذ كرار عبد الزهرة (قسم وقاية النبات ) لما قدموه من مساعدة في فترة الدراسة.

والشكر الجزيل الى جميع زملائي واخوتي الذين ساندوني خلال فترة الدراسة نسأل الله لهم دوام الموفقية والصحة والسلامة .

الباحث

## إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة نشهد بأننا اطلعنا على الرسالة الموسومة (دراسة العلاقة بين مستوى انتاج الـ Trichodermin ومقدرة الفطر *Trichoderma* sp على مقاومة مسببات موت بادرات نبات الباميا وتأثير منظمات النمو عليها) التي قدمها الطالب (سعد احمد علوان الطائي ) في قسم وقاية النبات ، وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها ووجدنا أنها جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير في العلوم الزراعية – وقاية النبات .

أ.د. حليمة زغير حسين
كلية علوم الهندسة الزراعية / جامعة بغداد
رئيس لجنة المناقشة

أ.م. د. عدنان عبد الجليل لهوف
كلية الزراعة / جامعة كربلاء
عضوا

م. د . استبرق محمد عبد الرضا
كلية الزراعة / جامعة كربلاء
عضوا

أ.م. د. ياسر ناصر حسين الحميري
كلية الزراعة / جامعة كربلاء
عضواً و مشرفاً

صدقت الرسالة من قبل مجلس كلية الزراعة - جامعة كربلاء

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

# اقرار المشرف

أشهد بأن الرسالة الموسومة الموسومة (دراسة العلاقة بين مستوى انتاج الـ Trichodermin ومقدرة الفطر *Trichoderma* sp على مقاومة مسببات موت بادرات نبات الباميا وتأثير منظمات النمو عليها) القدمةالطالب (سعد احمد علوان ) 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 : / 9 / 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 : / 9 / 2021

## المستخلص

اجريت الدراسة في مختبرات كلية الزراعة جامعة كربلاء في الموسم الدراسي 2020-2021 بينت النتائج عزل 42 عزلة تعود للفطر *Trichoderma* spp من عينات التربة وان نسبة الظهور كانت 42 % وبنسبة تردد 7.60% وكذلك تم عزل عدد من الفطريات المرافقة لجذور نباتات الباميا المصابة في محافظة كربلاء ، أذ حقق الفطر *Fusarium* spp أعلى نسبة مئوية للظهور التي بلغت 40 % .

اظهر الفطر *Macrophomina phaseolina* تأثيراً معنوياً في خفض نسبة الانبات التي بلغت 6.6 % وبنسبة تثبيط بلغت 93.5% واظهر الفطر *Fusarium* sp تأثيرات معنوية على نسبة الانبات التي بلغت 30% وبنسبة تثبيط 67.7% والفطر *AIternaria* sp اثر بشكل معنوي على نسبة الانبات فبلغت 26.6% ونسبة تثبيط 72% مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت نسبة التثبيط فيها 0.00%،اظهرت نتائج اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp ضد الفطريات الممرضة ، أنَّ عزلات الفطر *Trichoderma* spp تمتلك قدرة عالية على تثبيط المسببات المرضية *Macrophomina phaseolina*، *Fusarium* sp *Alternaria* sp اذ تراوحت نسبة التثبيط بين (90.07% -44.44%) في حين أظهر اختبار تأثير الراشح الفطري تأثير متباين على نسبة تثبيط النمو الفطري حيث تراوحت بين (41.6- 88.8%) و كان أعلى تأثيراً للراشح T.N2 بنسبة تثبيط 88.8 % على الفطر *Macrophomina phaseolina* وأقل نسبة تثبيط لراشح T.S3 الذي بلغ 41.60% على الفطر *Alternaria* sp أما معدل التأثير فتراوح بين 60.6- 78.96 % و كانت رواشح العزلة T.N2 الأعلى تأثيراً على نمو المسببات المرضية .

أظهرت نتائج الكشف عن مقدرة عزلات الفطر *Trichoderma* spp على إنتاج منظمات النمو النباتية ( $GA_3$ وIAA ) قدره جميع العزلات المنتخبة على إنتاج منظمات النمو بشكل متباين اذ أظهرت العزلة ( T.N2) أعلى انتاج للجبرلين بتركيز بلغ ( 290) مايكرو غرام /مل في حين كانت العزلة (T.H9) هي الأقل انتاجاً بتركيز بلغ (30) مايكرو غرام/مل ، أما منظم النمو IAA قد تبين أن هناك تبايناً في قدرة هذه العزلات على إنتاج منظم النمو حيث تفوقت العزلة (.T.S10) بشكل معنوي على جميع العزلات اذ بلغ (260) مايكرو غرام /مل ، في حين كانت العزلة (H3) هي الأقل انتاجاً بتركيز بلغ (90) مايكرو غرام/مل .

اوضحت نتائج الكشف عن السم الفطري Trichodermin اختلافاً معنوياً بتراكيز السم الفطري المنتج من قبل العزلات اذ تراوحت بين (331 - 60 مايكرو غرام / غم) وتفوقت العزلة T.H9 بشكل معنوي على جميع العزلات الاخرى في حين اظهرت نتائج التضاد بين العزلات الفطرية الخمسة المختبرة على وسط PDA في اطباق بتري وجود تضاد بين بين عزلتين T.H3, T.D2 وعدم وجود تضاد بين العزلات الثلاثة الاخرى .

أظهرت نتائج التجربة الحقلية لإضافة المستحضرات الحيوي للعزلات الفطرية زيادة معنوية في تأثيرها على النسبة المئوية لأنبات بذور الباميا وخفض النسبة المئوية لموت البادرات قياسا بمعاملة الفطرين الممرضين وكذلك اثرت بشكل معنوي في زيادة الوزن الطري لبادرات الباميا الذي تراوح بين (0.6- 1.07غم )، قياسا بمعاملة الفطر *Fusarium* sp و الفطر *Macrophomina phaseolina* فقط التي بلغت 0.39 و0.5 غم على التوالي .

أما ما يخصُ صفة طول بادرات الباميا فقد اثرت جميع المعاملات تأثيراً معنوياُ في زيادة طول النبات والذي تراوح بين 18-28 سم قياسا بمعاملة الفطر الممرض *Macrophomina phaseolina* و*Fusarium* sp فقط التي بلغت 15 و11.5 سم على التوالي ، وقد حققت جميع المعاملات ماعدا (T.B6+Aو T.N2+M ,T.H9+A) زيادة معنوية قياسا بمعاملة السيطرة التي بلغت 17 سم .أما صفة طول الجذر فلم يكن هناك تأثير معنوي على طول الجذر الذي تراوح بين 2-4 سم قياسا بمعاملة الفطر الممرض *Macrophomina phaseolina* الذي كان 1.5 مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت 1.8سم .اما المعاملة مع الفطر الممرض *Fusarium* sp كان لها تأثير معنوي في زيادة طول الجذر قياسا بمعاملة السيطرة التي بلغت 1.8سم .واوضحت النتائج تأثير المعاملات بزيادةٍ معنويةٍ على طول المجموع الخضري والتي تراوحت بين (16-25) سم قياسا بمعاملة الفطر *Macrophomina phaseolina* و *Fusarium* sp و السيطرة التي بلغت 13.5 ،15.4، 10 سم عدا T.N2+A لم تظهر تأثيراً معنوياً .

## قائمة المحتويات


| ت | المحتويات | رقم الصفحة |
|---|---|---|
| 1 | المقدمة | 1 |
| 2 | مراجعة المصادر | 3 |
| 1-2 | جنس *Trichoderma spp* صفاتة وتصنيفة | 3 |
| 2-2 | دور الفطر *Trichoderma spp* في المقاومة الحيوية | 5 |
| 3-2 | اليات تأثير الفطر *Trichoderma spp* | 7 |
| 1-3-2 | التطفل الفطري | 7 |
| 2-3-2 | التنافس | 7 |
| 3-3-2 | انتاج المضادات الحيوية | 8 |
| 4-3-2 | استحثاث المقاومة في النبات | 9 |
| 5-3-2 | تعزيز نمو النبات | 9 |
| 4-2 | الايض الثانوي للفطر *Trichoderma spp* | 10 |
| 1-4-2 | انتاج المضادات الحيوية | 10 |
| 2-4-2 | السم الفطري Trichodermin | 12 |
| 5-2 | انتاج منظمات النمو في عزلات الفطر *Trichoderma spp* وتعزيز نمو النبات | 13 |
| 6-2 | التقدير الكمي لحامض الجبرلين GA3 واندول حامض الخليك IAA | 15 |
| 7-2 | التصنيع الحيوي لمستحضر الفطر Trichoderma spp | 16 |
| 1-7-2 | الاوساط التخمرية والمواد الحاملة المستعملة في تنمية واكثار فطر المقاومة الاحيائية *Trichoderma spp* | 16 |
| 2-7-2 | اشكال تجهيز المستحضر الحيوي | 17 |
| 8-2 | استخدام التقانات الحزئية في تشخيص الفطريات | 18 |
| 9-2 | قواعد البيانات البيولوجية (NCBI) وبرنامج (BLAST) | 19 |
| 10-2 | الشجرة الوراثية Phylogentic Tree واستخدامها في الكشف الجزئي عن العلاقة الوراثية بين العزلات الفطرية | 19 |
| 11-2 | مرض موت البادرات الباميا | 20 |
| 3 | المواد وطرائق العمل | 22 |
| 1-3 | الاجهزة والادوات والمواد المستخدمة في الدراسة | 22 |
| 2-3 | تحضير الاوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص تنمية الفطريات | 24 |
| 1-2-3 | وسط البطاطا سكروز اكار Potato sucrose Agar | 24 |
| 2-2-3 | وسط البطاطا دكستروز اكار الجاهز Potato dextrose P.D.A | 24 |
| 3-2-3 | وسط الاكار المائي Water Agar (W.A) | 25 |
| 4-2-3 | وسط البطاطا سكروز السائل Potato sucrose Broth (P.S.B) | 25 |
| 5-2-3 | وسط نخالة الحنطة | 25 |
| 3-3 | جمع العينات | 25 |
| 1-3-3 | جمع عينات من التربة | 25 |
| 2-3-3 | جمع العينات من الجذور لعزل الفطريات الممرضة | 27 |

| | | |
|---|---|---|
| 4-3 | العزل والتشخيص الفطريات | 27 |
| 1-4-3 | عزل وتشخيص فطريات *Trichoderma spp* من عينات التربة | 27 |
| 2-4-3 | عزل الفطريات الممرضة المرافقة لنباتات الباميا المصابة | 27 |
| 5-3 | تنقية وتشخيص الفطريات المعزولة | 28 |
| 6-3 | حفظ العزلات الفطرية المعزولة | 28 |
| 7-3 | اختبار المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *Fusarium* spp و *Alternaria spp* و *M.phaseolina* مختبريا | 29 |
| 8-3 | اختبار القدرة التضادية لعزلات الفطر Trichoderma spp مختبريا ضد عزلات فطرية الممرضة | 30 |
| 9-3 | التشخيص الجزئي للعزلات الفطرية ذات القدرة التضادية العالية | 31 |
| 10-3 | تأثير الرواشح العزلات الفطرية للفطر Trichoderma spp spp ضد نمو العزلات الفطرية الممرضه | 31 |
| 11-3 | الكشف عن منظم النمو الجبرلين GA3 في رواشح الفطريات | 32 |
| 1-11-3 | تحضير الراشح العزلات الفطرية التسعة الفطر Trichoderma spp spp | 32 |
| 2-11-3 | استخلاص حامض الجبرلين من راشح العزلات الفطرية التسعة للفطر Trichoderma spp | 32 |
| 3-11-3 | عمل منحى قياسي ومقارنتها مع العزلات المنتجة لجبرلين GA3 | 33 |
| 12-3 | الكشف عن منظم النمو IAA في رواشح العزلات الفطرية التسعة لفطر Trichoderma spp | 34 |
| 1-12-3 | استخلاص والكشف عن منظم النمو IAA | 34 |
| 2-12-3 | عمل منحى قياسي لمنظم النمو IAA | 35 |
| 13-3 | الكشف عن قابلية عزلات الفطر الاحيائي Trichoderma spp المنتخبة على انتاج السم الفطري Trichodermin | 36 |
| 1-13-3 | الاستخلاص لسم الفطري Trichodermin | 36 |
| 2-13-3 | لتقدير الكمي والنوعي لسم Trichodermin باستخدام تقانة كروموتوكرافيا السائل فايق الأداء ( HPLC) High Performance Liquid Chromatography لمستخلص عزلات الفطر Trichoderma sp | 36 |
| 14-3 | الخصائص الكيميائية للتربة Soil chemical properties المعزول منها عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* sp المنتخبة | 37 |
| 1-14-3 | قياس درجة تفاعل التربة (PH) | 37 |
| 2-14-3 | قياس التوصيلية الكهربائية (EC) | 37 |
| 3-14-3 | قياس الكاربون العضوي والمادة العضوية | 37 |
| 15-3 | ختبار التوليفة بين عزلات الفطر Trichoderma spp المنتجة للسم الفطري Trichodermin ومنظمات النمو ضد العزلات الفطرية الممرضة | 38 |
| 1-15-3 | ختبار التضاد الحيوي لعدد من عزلات الفطر Trichoderma spp المنتجة للسم الفطري Trichodermin ومنظمات النمو النباتية فيما بينها مختبريا على وسط PDA | 38 |
| 2-15-3 | ختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر Trichoderma spp المنتجة للسم الفطري Trichodermin و منظمات النمو النباتية ضد | 39 |

| | | |
|---|---|---|
| | العزلات الفطرية الممرضة حقلياً في الاصص البلاستيكية | |
| 16-3 | التصاميم الإحصائية للتجارب المختبرية والحقلية | 41 |
| 4 | النتائج والمناقشة | 42 |
| 1-4 | العزل والتشخيص | 42 |
| 1-1-4 | عزل وتشخيص فطريات Trichoderma spp من عينات التربة | 42 |
| 2-1-4 | عزل الفطريات الممرضة المرافقة لنباتات الباميا المصابة | 43 |
| 2-4 | اختبارات المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *Fusarium* spp و *Alternaria spp* و *M.phaseolina* مختبرياً | 44 |
| 3-4 | اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد العزلات الفطرية الممرضة مختبريا | 45 |
| 1-3-4 | اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد الفطر *Fusarium* spp | 45 |
| 2-3-4 | اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد الفطر *Alternaria spp* | 47 |
| 3-3-4 | 3اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد الفطر *M.phaseolina* | 49 |
| 4-4 | تاثير راشح عزلات الفطر *Trichoderma sp* في النمو القطري للفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA مختبريا | 51 |
| 5-4 | التقدير الكمي والنوعي لمنظمات النمو $GA_3$ و, IAA في عزلات الفطر *Trichoderma spp* | 52 |
| 6-4 | التقدير الكمي والنوعي لسم Trichodermin باستخدام تقانة كروموتوكرافيا السائل فايق الأداء ( HPLC) High Performance Liquid Chromatography لمستخلص عزلات الفطر Trichoderma sp | 53 |
| 7-4 | تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلات الفطر *Trichoderma spp* المعزولة من منطقة الرايزوسفير | 60 |
| 1-7-4 | تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة الفطر *Trichoderma reesei* *Y.N.126.Saad* المعزولة من محافظة بغداد | 61 |
| 2-7-4 | تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة الفطر *Trichoderma reesei* *Y.N.127.Saad* المعزولة من محافظة الديوانية | 62 |
| 3-7-4 | تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة الفطر *T.pseudokoningii* *Y.N.128.Saad* المعزولة من محافظة الديوانية | 63 |
| 4-7-4 | تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة الفطر *Trichoderma reesei* | 65 |

| | | |
|---|---|---|
| | *Y.N.129.Saad* المعزولة من محافظة بابل | |
| 5-7-4 | تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة الفطر *Trichoderma viride* *Y.N.130.Saad* المعزولة من محافظة بابل | 66 |
| 6-7-4 | تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة الفطر *Trichoderma harzianum* *Y.N.131.Saad* المعزولة من محافظة النجف | 68 |
| 7-7-4 | تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة الفطر *Trichoderma asperellum* *Y.N.132.Saad* المعزولة من محافظة الناصرية | 69 |
| 8-7-4 | تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة الفطر *Trichoderma reesei* *Y.N.133.Saad* المعزولة من محافظة الناصرية | 71 |
| 9-7-4 | تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة الفطر *Trichoderma reesei* *Y.N.134.Saad* المعزولة من محافظة الناصرية | 72 |
| 8-4 | الخصائص الكيميائية للتربة Soil chemical properties المعزول منها عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma sp* المنتخبة | 73 |
| 9-4 | اختبار التضاد الحيوي لعدد من عزلات الفطر Trichoderma spp المنتجة للسم الفطري Trichodermin ومنظمات النمو فيما بينها مختبريا على وسط PDA | 74 |
| 10-4 | اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma spp* المنتجة للسم الفطري Trichodermin و منظمات النمو ضد العزلات الفطرية الممرضة حقلياً في الاصص البلاستيكية | 75 |
| 1-10-4 | اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد عزلة الفطر الممرض *M.phaseolina* حقلياً في الاصص البلاستيكية | 75 |
| 2-10-4 | اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد عزلة الفطر الممرض *Alternaria spp* حقلياً في الاصص البلاستيكية | 77 |
| 5 | الاستنتاجات والتوصيات | 80 |
| 1-5 | الاستنتاجات | 80 |
| 2-5 | توصيات | 81 |
| 6 | المصادر | 82 |
| 1-6 | المصادر العربية | 82 |
| 2-6 | المصادر الاجنبية | 86 |
| 7 | الملاحق | 109 |

## قائمة الجداول


| رقم الجدول | عنوان الجدول | رقم الصفحة |
|---|---|---|
| جدول 1 | الأجهزة والادوات المستخدمة في أجراء التجارب الواردة في البحث | 22 |
| جدول 2 | المواد الكيميائية المستعملة في إجراء التجارب الواردة في هذه الدراسة | 23 |
| جدول 3 | الاوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة | 23 |
| جدول 4 | الفطريات المستخدمة في الدراسة | 24 |
| جدول 5 | رموز العينات ومكان جمعها ونوع النباتات التي جمعت بالقرب من جذورها | 26 |
| جدول 6 | تراكيز وامتصاصيه المادة القياسيةGA3 | 33 |
| جدول 7 | تراكيز وامتصاصيه المادة القياسية لمنظم النمو IAA | 35 |
| جدول 8 | المعاملات التضادية بين عزلات الفطر *Trichoderma spp* المنتخبة | 39 |
| جدول 9 | يوضح العزلات الفطرية المرافقة لعينات التربة المجموعة من محافظات العراق | 42 |
| جدول 10 | يوضح العزلات الفطرية المرافقة جذور وقواعد سيقان نباتات الباميا | 43 |
| جدول 11 | اختبار القدرة الامراضية للفطريات المعزولة في هذه الدراسة في انبات بذور اللهانة في اطباق بتري | 45 |
| جدول 12 | النسبة المئوية للتثبيط لعزلات الفطر Trichoderma spp ضد الفطرالممرض Fusarium spp | 46 |
| جدول 13 | النسبة المئوية للتثبيط لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد الفطرالممرض *Alternaria spp* | 48 |
| جدول 14 | النسبة المئوية للتثبيط لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد الفطرالممرض *M.phaseolina* | 50 |
| جدول 15 | تأثير راشح عزلات الفطر Trichoderma sp في تثبيط النمو القطري لعزلات الفطريات الممرضة | 51 |
| جدول 16 | التقدير الكمي والنوعي لمنظمات النمو GA3 و IAA لعزلات الفطر Trichoderma sp | 53 |
| جدول 17 | التقدير الكمي والنوعي لسم Trichodermin لعزلات الفطر Trichoderma sp | 54 |
| جدول 18 | العزلات الفطرية للفطر *Trichoderma spp* المشخصة | 60 |
| جدول 19 | عزلات الفطر Trichoderma reesei .Y.N.126.Saad المستخدمة في الشجرة | 61 |

| | | |
|---|---|---|
| | الوراثية | |
| **جدول 20** | عزلات الفطر Trichoderma reesei .Y.N.127.Saad المستخدمة في الشجرة الوراثية | 62 |
| **جدول 21** | عزلات الفطر T.pseudokoningii.Y.N.128.Saad المستخدمة في الشجرة الوراثية | 64 |
| **جدول 22** | عزلات الفطر Trichoderma reesei .Y.N.129.Saad المستخدمة في الشجرة الوراثية | 65 |
| **جدول 23** | عزلات الفطر Trichoderma viride .Y.N.130.Saad المستخدمة في الشجرة الوراثية | 67 |
| **جدول 24** | عزلة الفطر Trichoderma harzianum .Y.N.131.Saad المستخدمة في الشجرة الوراثية | 68 |
| **جدول 25** | عزلات الفطر Trichoderma asperellum. Y.N.132.Saad المستخدمة في الشجرة الوراثية | 70 |
| **جدول 26** | عزلات الفطر *Trichoderma reesei .Y.N.133.Saad* المستخدمة في الشجرة الوراثية | 71 |
| **جدول 27** | عزلات الفطر ا Trichoderma reesei .Y.N.134.Saad لمستخدمة في الشجرة الوراثية | 73 |
| **جدول 28** | الخصائص الكيميائية للترب المعزول منها عزلات الفطر Trichoderma sp | 74 |
| **جدول 29** | التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر Trichoderma ضد العزلة الفطر الممرض M.phaseolina حقلياً في الاصص البلاستيكية | 75 |
| **جدول 30** | التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma spp* على صفات النمو لبادرات الباميا | 76 |
| **جدول 31** | التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp ضد العزلة الفطر الممرض *Alternaria spp* حقلياً في الاصص البلاستيكية | 77 |
| **جدول 32** | التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma spp* على صفات النمو لبادرات الباميا | 78 |

## قائمة الاشكال


| رقم الشكل | عنوان الشكل | رقم الصفحة |
|---|---|---|
| **شكل 1** | يوضح المظهر الخارجي للحامل الكونيدي للفطر*Trichoderma spp* | 4 |
| **شكل 2** | التركيب الكيميائي للسم Trichodermin | 12 |
| **شكل 3** | التركيب الكيميائي لمنظمات النمو IAA و GA3 | 14 |
| **شكل 4** | يمثل المنحنى القياسي ل $GA_3$ | 34 |
| **شكل 5** | يمثل المنحنى القياسي ل IAA | 35 |
| **شكل 6** | القدرة التضادية للعزلات الفطرية للفطر *Trichoderma spp* ضد الفطر الممرض *Fusarium spp* | 46 |
| **شكل 7** | القدرة التضادية للعزلات الفطرية للفطر *Trichoderma spp* ضد الفطر الممرض *Alternaria spp* | 48 |
| **شكل 8** | القدرة التضادية للعزلات الفطرية للفطر *Trichoderma spp* ضد الفطر الممرض *M.phaseolina* | 50 |
| **شكل 9** | التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري الماده القياسية Trichodermin | 55 |
| **شكل 10** | التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.S10 | 55 |
| **شكل 11** | التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.B6 | 56 |
| **شكل 12** | التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.D2 | 56 |
| **شكل 13** | التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.D8 | 57 |
| **شكل 14** | التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.S2 | 57 |
| **شكل 15** | التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.N2 | 58 |
| **شكل 16** | التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.H9 | 58 |
| **شكل 17** | التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.S3 | 59 |
| **شكل 18** | التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.H3 | 59 |
| **شكل 19** | يمثل الشجرة الوراثية للفطر *Trichoderma reesei .Y.N.126.Saad* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ837930 | 61 |
| **الشكل 20** | يمثل الشجرة الوراثية للفطر *Trichoderma reesei .Y.N.127.Saad* | 63 |

| | | |
|---|---|---|
| | المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ831521 | |
| **الشكل 21** | يمثل الشجرة الوراثية للفطر *T.pseudokoningii .Y.N.128.Saad* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ837929 | 64 |
| **الشكل 22** | يمثل الشجرة الوراثية للفطر *Trichoderma reesei .Y.N.129.Saad* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ970766 | 66 |
| **الشكل 23** | يمثل الشجرة الوراثية للفطر *Trichoderma viride .Y.N.130.Saa d* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ970842 | 67 |
| **الشكل 24** | يمثل الشجرة الوراثية للفطر*Trichoderma harzianum .Y.N.131.Saad* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ994502 | 69 |
| **الشكل 25** | يمثل الشجرة الوراثية للفطر*Trichoderma asperellum .Y.N.132.Saad* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ970841 | 70 |
| **الشكل 26** | يمثل الشجرة الوراثية للفطر *Trichoderma reesei .Y.N.133.Saad* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ837930 | 72 |
| **الشكل 27** | يمثل الشجرة الوراثية للفطر *Trichoderma reesei .Y.N.134.Saad* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ994500 | 73 |

## 1- المقدمة

يعد نبات الباميا .L *Abelmoschus esculentus* احد محاصيل الخضر الصيفية المهمة ينتمي للعائلة الخبازية Malvaceae والتي تزرع في مختلف انحاء القطر لما لها من اهمية اقتصادية (Benchasri ، 2012) ،كون ثمار الباميا مرغوبة بدرجة كبيرة لدى معظم سكان القطر و تحتوي ثمارها على بعض العناصر الغذائية كالفسفور والكالسيوم والمواد الكاربوهيدراتيه والبروتينات ونسبة متوسطة من الفيتامينات مثل فيتامين A و C (Santos، 2019) إذ بلغت المساحة المزروعة بمحصول الباميا في عام 2014 في العراق 16,75الف هكتار والإنتاجية 7403كغم /هكتار والإنتاج الكلي بلغ 124000 طن (Issa و Jabbar، 2019 ). نبات الباميا من النباتات التي تصاب بالعديد من الآفات الزراعية ومنها الامراض الفطرية والتي زاد انتشارها مع الزراعة المحمية ومن اهم هذه الامراض ، مرض موت البادرات وتعفن الجذور والساق ، وهي من الامراض الشائعة على محصول الباميا في الزراعة المكشوفة والمحمية وتسبب هذه الامراض عن الفطريات *Fusarium* spp و *Macrophomina phasiolian* و *Aspergillus sulphorus* و *Rhizoctonia solani* و *Phytophthora* spp (كريم ، 2012 ،Ali واخرون ،2013 ، Ahmed واخرون ،2013 ، Rahim و dawar ، 2015 ) .

أنُ استعمال المبيدات الكيميائية أثار الكثير من المخاوف من حيث تأثيراتها على البيئة وصحة الانسان فضلاً الى الأثارالسلبية لمتبقياتها وظهور صفة المقاومة من قبل الكائنات الممرضة (Piel وأخرون ، 2019 ، Juntarawijit وJuntarawijit ، 2018 ،Fan وأخرون ، 2017 ) ومع ذلك ، فإن اكتشاف أنواع جديدة من مبيدات الفطريات اصبح أكثر صعوبة وأكثر تكلفة من الوقت الماضي (Mcdougall، 2020 )

وهذا ما أدى الى حث الباحثين لأيجاد وسائل بديلة عن استخدام المبيدات الكيمائية فقد تم اللجوء في السنوات الاخيرة الى استعمال الكائنات الحية الدقيقة في مجال المكافحة الاحيائية من اهمها استخدام انواع الفطر *Trichoderma spp* بسبب أمتلاكها العديد من الاليات في السيطرة على المسببات المرضية وخفض الإصابة بها ( Harman ، 2006) كما استخدم في المكافحة الاحيائية تشكل *Trichoderma spp* 90% (Ngaraju وأخرون، 2012) كما يعتبر جنس *Trichoderma spp* من الفطريات التي تعطي نتائجَ جيدة في المكافحة البيولوجية وذلك بسبب امتلاكها القدرة على الاستشعار عن بعد وسرعه في مهاجمه المسببات المرضية والتعرف عليها وكبح نموها حيث تمتلك أنزيمات تحلل جدران الغزل الفطري

للمسببات المرضية chitinase, pretoase , B-1,3-glucanase فضلاً عن دوره في تحسين نمو النبات (Al-Ani ، 2018) .

يمتلك جنس *Trichoderma spp* القدرة على انتاج وافراز مركبات الايض الثانوي بغزارة والتي تعمل كمضادات حيوية ضد العديد من المسببات المرضية ومن هذه المركبات Trichodermin ,Peptaibols, Trichorziannines والتي تعمل على تثبيط او قتل الفطريات الممرضة (Sharma وأخرون 2011 ، شمران ،2017) . فضلا عن القدرة التضادية التي تمتلكها عزلات الفطر *Trichoderma spp* للمسببات المرضية تمتلك القدرة على تعزيز نمو النباتات وذلك من خلال افراز العديد من المواد الشبيهة بمنظمات النمو النباتية تمتلك عدد من عزلات *Trichoderma spp* القدرة على انتاج وافراز منظمي النمو GA3,IAA التي تعمل على تعزيز نمو النباتات(عبود وأخرون ، 2008) كما تنتج سلالات *Trichoderma spp* جزيئات مشابهة للسيتوكينين (عوامل نمو) مثل: Zeatyn و GA3 gibberellin أو GA3- related والتي اكتشفت مؤخراً، وإن التحكم بإنتاج هذه المركبات وتحفيز إنتاج الهرمونات النباتية يمكن أن يحسن التسميد الحيوي مما يودي الى تحفيز النمو في النبات (Osiewacz, 2002)

وقد هدفت الدراسة الى دراسة العلاقة بين مستوى انتاج الـ Trichodermin ومقدرة الفطر *Trichoderma* spp على مقاومة مسببات موت بادرات نبات الباميا وتأثير منظمات النمو عليها ، اذ تمحورت الدراسة الى :

1-عزل عدد من عزلات الفطر *Trichoderma* spp وتشخيصها مظهرياً

2- اختبار قدرة التضاد الحيوي لجميع عزلات الفطر *Trichoderma* spp على عدد من المسببات المرضية الفطرية للنباتات مختبريا وحقليا .

3-الكشف عن قدرة العزلات لانتاج الـ Trichodermin وانتاج منظمات النمو و دراسة تأثيرها.

4-التشخيص الجزئي للعزلات المنتجة لسم الفطري Trichodermin ولمنظمات النمو . بتحليل تتابع القواعد النتروجينية لهذه العزلات ومقارنتها مع ت العزلات العالمية .

5-امكانية عمل توليفات مختلفة بين عدد من العزلات الفطرية المنتجة لسم Trichodermin وتلك المنتجة لمنظمات النمو النباتية . واختبار تاثيراتها على مسببات امراض النبات .

## 2 - مراجعة المصادر

### 2-1 جنس *Trichoderma* spp صفاته وتصنيفه

يعد العالم persoon أول من أكتشف جنس *Trichoderma spp* عام 1794 معتمداً في ذلك على طوره اللاجنسي الذي تم عزله من التربة والمواد العضوية ، وصنف من قبل العالم Rifai عام 1963 ،اذ كان يصنف الفطر Trichoderma spp سابقا تحت قسم الفطريات الناقصة Deuteromycotina وصف Hyphomycetesورتبة Moniliales وعائلة Moniliaceae و طوره الجنسي يعود الى تحت قسم الفطريات الكيسية Ascomycotina رتبة Hypocreales جنس *Hypocrea* spp (Alexopoulos واخرون ،1996 )

***kingdom:*** *Fungi*
***Division :*** *Ascomycota*
***Sub division :*** *Pezizomycotina*
***Classe :*** *Sordariomycetes*
***Sub classe :*** *Hypocreomycetidae*
***Ordre :*** *Hypocreales*
***Family :*** *Hypocraceae*
***Genus****: Trichoderma spp (Hypocria* spp*)*

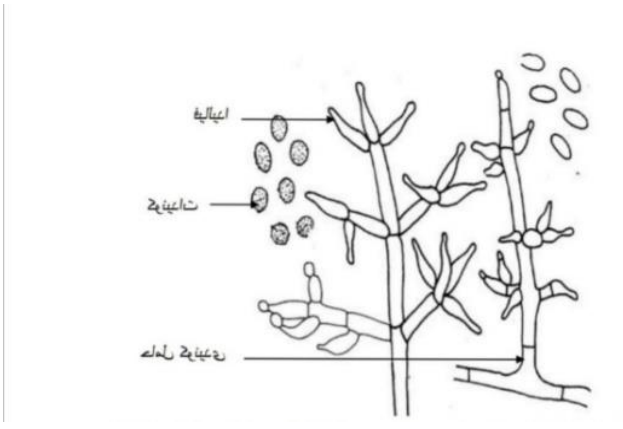
يتكون جنس *Trichoderma* spp من عدد من فطريات مترادفة الاسماء والذي أشار إليها Persoon قبل أكثر من مئة عام وتكون هذه الفطريات شائعة الانتشار، تعزل من المواد العضوية المتحللة والتربة، كما يمكن عزلها بسهولة وتنميتها على الأوساط الغذائية المختلفة ،وتكون سريعة النمو على العديد من المواد الغذائية المتنوعة ذات قدرة على إنتاج المضادات الحيوية بالاضافة القدرة على التطفل Mycoparstisc (Bisset ،1991)

أنَ تغير درجات الحرارة والرطوبة بفصول السنة له تأثيرٌ على توزيع الفطر *Trichoderma spp* في التربة (Widden وAbitbol،1980) ومن ناحية أخرى تزداد كثافة الفطر *T.harzianum* بزياده مستوى الرطوبة في حين أن زيادة الرطوبة تكون غير ملائمة لنمو الفطريات الأخرى في التربة ويحقق الفطر أعلى كثافه عند محتوى رطوبي 75% من السعة الحقلية ويعتبر هو الافضل (جبارة،2002) ينمو الفطر بكثافة عالية عند السطح في منطقة

الرايزوسفير ويقل كلما ازداد العمق في التربة بسبب قلة الأوكسجين وتغيرات الرطوبة والحرارة (Warcup، 1957) .

كما تمتلك القدرة على النمو بسرعة على الأوساط الغذائية الصناعية، وإنتاج اعداد كبيرة من الجراثيم الكونيدية الخضراء أو البيضاء الصغيرة من خلايا يطلق عليها conidiogenoas توجد هذه الخلايا في نهاية التفرعات للحوامل الكونيدية وبالاعتماد على هذه الصفات تسهل عملية التعرف على جنس *Trichoderma spp* غير أنَّه من الصعوبة تحديد الانواع وذلك بسبب التشابه الكبير بين صفات الانواع ويكون من الصعب تسمية النوع الأ بعد دراسة واسعة وتفصيلية ( Kullnig-Gradinger واخرون ،2002)

تبدو مستعمرة *Trichoderma spp* بمظهر سبحي بصورة خفيفة أو مندمجة، وتنتج الجراثيم الكونيدية غزل فطري أبيض ، كما تبدو المستعمرة خلال الأيام الأولى شفافة وفي اليوم الرابع من نموها يتغير لونها إلى الأخضر على الأجزاء الهوائية غزل فطري ، يتوافق هذا مع تشكل خطوط دائرية أخرى منتظمة مركزية . يظهر غزل فطري تحت المجهر الضوئي مركباً من هيفات صفراء ، مقسمة و متفرعة ذات جدران ملساء ، الحوامل الكونيدية مخروطية أوهرمية كثيرة التفرعات ، تحمل الفياليدات ذات هيئة قارورية والتي تحمل بدورها الجراثيم الكونيدية (Landreau، 2001)



**الشكل(1) يوضح المظهر الخارجي للحامل الكونيدي للفطر *Trichoderma spp* (Samueles واخرون ،1994)**

## 2-2 دور الفطر *Trichoderma* spp في المقاومة الحيوية

يعد العالم Weinding أول من اكتشف الدور الذي يلعبه الفطر *Trichoderma spp* في المكافحة الحيوية ولما يمتلكه من صفات منها سهولة عزله وسرعه نموه على الأوساط الغذائية، عدم احتياجه إلى متطلبات غذائية ،قد استخدمت انواع *Trichoderma* spp كعوامل مقاومة احيائية للعديد من فطريات التربة ومنها *Trichoderma* spp والذي نجح كبديل للمبيدات الكيميائية (Montealegere وأخرون ، 2010) ويعد جنس *Trichoderma* spp عامل المكافحة الواعد ضد العديد من فطريات الممرضة لنباتات بسبب قدرته على الانتشار الواسع في جميع الترب تقريبا وفي نطاق واسع من أنحاء العالم (kacprza وآخرون ،2014 )

كما يعد جنس *Trichoderma* spp اقل كلفة في مقاومة الأمراض النباتية ،وليس له تأثيرات على الكائنات المفيدة ،ولا على الإنسان والحيوان والحياة البرية ويكون أمن وفعال في جميع البيئات المسيطر عليها و يتحلل في السلسلة الغذائية وينتج مضادات حيوية ويحفز نمو النبات ، يستحث المقاومة في النبات (Saba وآخرون،2012 ) بجانب ذلك يساعد النبات في الحصول على بعض العناصر الأساسية من التربة مما يؤدي الى تحسين نمو النبات وأيضا يسهم في تحفيز النمو عن طريق انتاج بعض منظمات النباتية المحفزة لنمو وانتاجية النبات من خلال اشتراكها في دورة العناصر الطبيعية لكل من او P و K و Fe و Mn و Zn ، كما تكسب العائل النباتي المقاومة لبعض المسببات المرضية في التربة (Harman ، 2006 ، سعيد وآخرون ، 2014 )

وأظهر *Trichoderma harzianum* قدرةً عالية في مقاومة مرض سقوط البادرات الناتج عن الفطر Rhizoctonia solani على محصول الطماطة (الشعبي وآخرون،2007) كما استعمل *Trichoderm asperellum* في حماية نبات الطماطة ضد الذبول الفيوزارمي الناتج عن فطر *Fusarium oxysporuim* على محصول الطماطة وكذلك أدى إلى زيادة في نمو النبات من خلال (انتاج حامض IAA وزياده نشاط انزيم protease و زيادة جاهزيه الفسفور ) (singh وآخرون ،2019) كما بين Kilonzi وآخرون (2020 ) أن الفطر *Trichoderma asperellum* وفر حماية كاملةً لنبات ضد الفطر الممرض *Phytophthora infestans* المسبب لمرض اللفحة المتأخرة على الطماطة من خلال زيادة محتواه في فينولات ،حامض السالسليك وتحفيز المقاومة الجهازية و كذلك الانزيمات ، كما أثبت الفطر *Trichoderma longibrach* قدرةً عاليةً في مقاومة مرض تعفن البذور وموت البادرات في محصول الطماطة

المتسبب عن الفطريات *Rhizoctonia solani*، *Sclerotium refirii* ، ، *Fusarium solani* (Mahde وآخـــرون ، 2019 و Meshu وآخـــرون،2019 ) كـــذلك ادى اســـتخدام *Trichoderma asperelloides* إلى مقاومـه العديد من المسببات المرضية *Alternaria alternata*، *Botrytis cinera* ، *Phytophthora spp*، *Pythium ultima* ، *Rhizoctonia solani*، *Sclerotium rolfsii* (Samuels و اخرون، 1994 و Gal-emed واخرون، 2011 وDoley وJite ،2012 و Ramírez- Criño واخرون ،2020 )

وقد تمكن Al–Hamadany (1988) من اثبات كفاءة خمس عشرة عزلةً من الفطر *Trichoderma* spp. ضـــــــد الفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لسقوط بادرات السمسم ، اذ سبب خفض معنوي لنسبة البادرات الميتة في ثلاث عزلات مقارنة مع معاملة الفطر *Rhizoctonia solani* لوحده كما أظهر الفطر *Trichoderma harzianum* فاعلية في مقاومة الفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لمرض ذبول الحنطة وتعفن البذور وموت البادرات في الحنطة و الطماطة (علوان ،1996 و عباس ، 1998 و صالح،1999 وبدن، 1996 ).

لقد ادت معاملة بذور البزاليا بابواغ الفطرين *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma koningii* الى توفير حماية جيدة من مرض الذبول المتسبب عن الفطر *Pythium spp* (Hadar وآخرون ،1984)، وكان لمعاملة بذور الخيار والطماطة والبزاليا و الفلفل بفطري المقاومة الإحيائية *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma hamatum* أثر في خفض نسبة الإصابة بموت البادرات المتسبب عن شبيه الفطر *Pythium aphanidermatum* (Sivan وآخرون ، 1984).كذلك أظهر استخدام *Trichoderma harzianum* نجاحاً كبيراً في مقاومة مرض موت البادرات لنبات الخيار المتسبب عن شبية الفطر *Pythium ultimum* (Paulitze وآخرون ، 1990). كما اوضحت دراساتٌ سابقة كفاءة فطريات المقاومة الاحيائية *Trichoderma harizianum* و *Gliocladium viens* في خفض نسبة الاصابة بأمراض تعفن جذور العدس المتسبب عن فطريات *Macrophomana phaseolina*، *Rhizoctonia solani*، *Fusarium spp* (Ehteshamul وأخرون 1992) وقد ثبطت فطريات المقاومة الاحيائية *Trichoderma koningii* و *Trichoderma viride* نمو الغزل الفطري للفطر الممرض *Sclerotium rolfsii* على الوسط الغذائي (Iqbal وآخرون ،1995) .

## 2-3 آليات تأثيرالفطر *Trichoderma* spp في المكافحة الاحيائية

### 2-3-1 التطفل الفطري :

يمتلك الفطر *Trichoderma* قدرةً على التطفل او قتل الفطريات المسببة للإمراض النباتية المختلفة والذي تعتبر كألية مهمة لنجاحه كعامل مقاومةٍ حيوية (Mukherjee واخرون ،2012) اذ يعتبر التطفل الفطري آلية مباشرة للمقاومة الحيوية والتي تعمل بعدة مراحل منها التعرف على المسببات المرضية والتطفل واستعمار المسببات الامراض النباتية ، حيث استخدم بشكل واسع في المقاومة الحيوية على الفطريات والديدان الثعبانية بسبب قدرته على التطفل ومن هذه الفطريات *T.harizanum* و *T.viern*s و *T.aspeselleum* وغيرها من الانواع الاخرى ( Harman 2006 ، Druzhinina، واخرون 2011) حيث تكون قادرة على تثبيط مسببات الامراض النباتية في البيئات المختلفة (Chaverri واخرون ،2011) وذلك باستخدام ستراتيجيات تطفل متعددة (Romao واخرون ،2012 و Atonasova واخرون ،2013) حيث تعتبر عملية التطفل عملية معقدة للغاية حيث تحتاج الى عملية كشف عن المسببات المرضية بطريقة الانتحاء الكيميائي و تحطيم الجدار الخلوي للمسبب المرضي (Lorito واخرون ،2010) وذلك من خلال انتاج مركبات (انزيمات) والبيتابيول و والكايتيز التي تعمل على تحطيم الجدار الخلوي ( Druzhinina واخرون ،2011) الذي يعتبر جانبا هاما من التطفل الفطري والسيطرة غلى مسببات الامراض النباتية (Mukherjee واخرون ،2011) كما يفرز *Trichoderma* spp عدد من المركبات β-(1،6)-glucanases،chitinases، proteaes التي تعمل على تحليل الجدار الخلوي للمسببات المرضية واثبت أنَّ لها دوراً في عملية التطفل علما انه يتم تحفيزها في ظروف التطفل ( Benitez واخرون ،2004) .

### 2-3-2 التنافس

التنافس هي ألآلية التقليدية للمكافحة الاحيائية لمسببات الأمراض النباتية (Singh واخرون ،2013) ولا يحدث التنافس بين الكائنات الحية الدقيقة إلا عندما تكون الموارد قليلة مثل مغذيات التربة والمساحة الحيز الحيوي . في هذه الحالة تنتج عوامل المقاومة الاحيائية مركبات ثانوية قادرة على تثبيط أو ايقاف النمو وغيرها من أنشطة الفطريات الممرضة، وبالتالي تمنح مزايا بيئية على منافسيها. تستفيد الاحياء المجهرية من الموارد المتاحة للنمو، تاركة المسببات الأمراض النباتية مغذيات غير كافية لنموها وبالتالي تجويعها (Chaube واخرون ،2005). تتنافس الفطريات الاحيائية بشكل إيجابي على الحديد مما يتسبب في قمع Fusarium spp ( Segarra

واخرون ،2010) الحديد هو مغذي معدني أساسي للعديد من الميكروبات. يوجد الحديد في حالةٍ مرتبطةٍ مع مركبات اخرى ، مما يجعله غير متوفر للميكروبات ( Miethke ،2013) ولدى *Trichoderma* spp قدرة كبيرة على استغلال مغذيات التربة، مما يجعلها أكثر كفاءة وقدرة على منافسة العديد من ميكروبات التربة الأخرى (الفطريات والبكتيريا). ويمكن أن تكون هذه العملية ذات صلة بإنتاج الأحماض غير العضوية، أي أحماض الستريك والفوماريك التي تقلل من درجة حموضة التربة وتزيد من ذوبان الفوسفات والمغذيات الدقيقة (الحديد والمنغنيز) (Schuster و Schmoll ، 2010 ) وهذا قد يكون أكثر أهمية في السيطرة على الأمراض النباتية لأن *Trichoderma* يمنع حصول المسببات المرضية على العناصر الغذائية المتاحة للنمو والتطور وبالتالي يجعلها غير فعالة في التسبب في أي مرض. حتى أن بعض أنواع *Trichoderma* spp أظهرت قدرة على تحسين أنشطة التركيب الضوئي والتنفس للنباتات، مما أدى إلى قدرتها على إعادة إنتاج التعبير الجيني للنباتات، ربما من خلال تنشيط عدد محدود من المسارات العامة للنباتات (Shoresh واخرون ،2010).

**2-3-3 انتاج المضادات الحيوية**

تعد انواع الفطر *Trichoderma spp* من الفطريات الغنية في انتاج مركبات الثانوية المستخدمة في المكافحة الاحيائية لأمراض النباتات (Mukherjee واخرون ،2012). أُفيد بأن مضادات الحيوية منخفضة الوزن الجزيئي تنتج بواسطة *Trichoderma spp* لمنع نمو الفطريات المسببة للأمراض النباتية (Gajera واخرون ،2013) كما تلعب المستقلبات الثانوية أدوارًا مهمه في التفاعلات مع النباتات يمكن أن تكون الأنشطة المضادة للاحياء المجهرية نتيجة للعديد من مستقلبات الثانوية مثل peptaibols،terpenes، polyketides، gliotoxin ، gliovirin التي ينتجها الفطر *Trichoderma spp* (Vinale واخرون ،2008) وتشمل المركبات الأيضية الأخرى tricholin،harzianic acid، viridian، gliosoprnins ، heptelidic acid،6-pentyl-α-pyrone، massoilactone (Mukherjee واخرون ، 2012) وتصنَّف المركبات الثانوية إلى فئتين رئيسيتين: الاولى مركبات polyketide synthases و non-ribosomal peptide synthase (Baker واخرون،2012)والاخرى، تتكون Peptaibols من حمض 2-أمينو أيزوبوتيريك وغيرها من الأحماض الأمينية غير البروتينية، التي يتم إنتاجها كمستقلبات ثانوية مع أنشطة المضادات الحيوية ضد الفطريات والبكتيريا المسببة للأمراض. تم اكتشاف Peptaibol التي ينتجها الفطر *T. pseudokoning* يمكن أن تحفز موت الخلايا المبرمج في مسببات الأمراض الفطرية النباتية، مما يتسبب في موت

مسببات الأمراض(Shi واخرون ،2012). وهي منتجات طبيعية يتم تخليقها حيويا بواسطة العديد من الفطريات وتعمل جنبا إلى جنب مع الإنزيمات المحللة للجدار الخلوي في تثبيط أو منع نمو الفطريات المسببة للأمراض منعا كاملا و/أو إثارة تطور المقاومة النباتية المستحثة ضد مسببات الأمراض(Mukherjee واخرون ،2011). وقد أظهرت الأبحاث أن هذه المركبات ذات تأثيرات إيجابية قوية على نمو النبات ومقاومته في النباتات إلى الضغوط الاحيائية واللاحيائية (Keswani واخرون ،2014)

**2-3-4 استحثاث المقاومة في النبات**

بصرف النظر عن قدرة انواع *Trichoderma* على مهاجمة مسببات الأمراض النباتية وتثبيط نموها، أظهرت العديد من الدراسات استحثاث المقاومة الجهازية والمحيطية ضد مجموعة واسعة من مسببات الأمراض (Harman واخرون ،2004، Gruber واخرون 2011) علماً أنَّ محفزات المقاومات الجهازية في النباتات هي نتيجة للتفاعلات المعقدة بين المركبات المختلفة التي تطلقها الاحياء المجهرية والمستقبلات النباتيةالتي تحفز الخلايا النباتية على التغيرات الفسيولوجية والبيوكيميائية. ومع ذلك، فإن هذه العمليات تكون ممكنة عندما تحفز المقاومة المكتسَبة الجهازية (SAR) المقاومة في أوراق النباتات بأكملها وتعزز إنتاج جزيء الإشارة الدفاعية، حمض الساليسليك (SA)، لمزيد من الإشارات (Kachroo و Robin ،2013) فضلاً عن ذلك ، تم الكشف عن انواع *Trichoderma* spp أنها تحفز تصنيع البروتينات التنظيمية في النباتات خاصة تحت إجهاد مرضي معين، تقوم هذه البروتينات التنظيمية باكتشاف مستجيبات الميكروبات وتنشيط الأنظمة الدفاعية للنبات ( Saenz-Mata و، Jimenez 2012). ويجب معرفة أن المقاومة المستحثة تختلف من نبات إلى آخر بسبب تأثير العوامل البيئية، ومسببات الأمراض المعنية، وعلاقة المتكافلين في طبقة الجذور(Schuster و Schmoll،2010 و Contreras واخرون ،2016)

**2-3-5 تعزيز نمو النبات**

تستعمر الاحياء المجهرية ومنها الفطر *Trichoderma* spp جذور النبات، وتؤدي في الوقت نفسه دوراً مفيداً في المكافحة الاحيائية ، إذ تحمي النبات من مسببات الأمراض المنقولة بالتربة، وتحفز نمو النبات (Harman ،2011) وغالبًا ما تحدث هذه العلاقات المفيدة بين النباتات والميكروبات في الغلاف الرايزوسفير، مما يحسن من نمو النبات أو يساعده على التغلب على الضغوط الاحيائية أو اللأحيائية (Zamioudis و Pieterse ،2012) تحفز الهرمونات

النباتية نمو الجذور، وبالتالي زيادة السطح الامتصاصي لجذور النبات. هذه الهرمونات النباتية تشمل السيتوكاينين، إندول -3-حمض الخليك، والجبرلين (Tjamos واخرون ،2010) ومن أمثلة المركبات المعزولة من *Trichoderma* spp التي تعزز نمو النبات بطريقة تعتمد على التركيز،Harzianopyridone و PP6 و trichocereus A-D و koninginins و cyclonerodiol و harzianolide harzianic acid (HA) وقد تم عزل مركب أيض ثانوي جديد -السيرينولكتون -وتمييزه من *Trichoderma spp* ، والذي كان قادراً على تغيير نمو شتلات الطماطة تغيراً إيجابياً بعد ثلاثة أيام من المعاملة، وبالمثل، وجد أن HA وحمض أيزو - هارزيانيك الموجود في مستقلبات *T.harzianum* يعزز نمو النبات، من خلال الربط القوي للحديد (Vinale واخرون ، 2012 ،2014).

## 4-2 الايض الثانوي للفطر *Trichoderma* spp

### 1-4-2 المضادات الحيوية

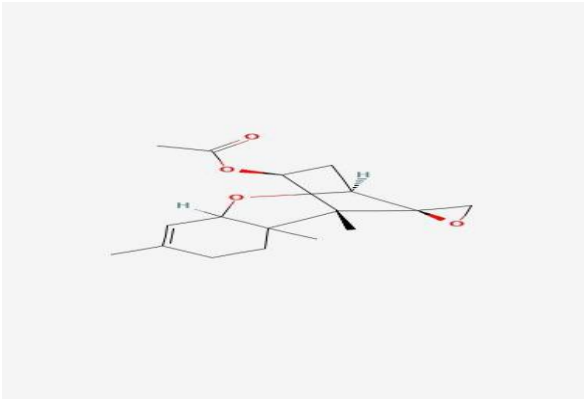
قد تكون مركبات الايض الثانوي من الكائنات الحية الدقيقة لها دور كبير في عملية التضاد للفطريات المسببة للأمراض النباتية المهمة (Daoubi واخرون ، 2009) ومن بين الكائنات الحيه الدقيقة المختلفة يعتبر الفطر *Trichoderma* spp من اقوى عوامل المكافحة الاحيائية المستخدمة اليوم بسبب انتاجه مجموعة كبيرة ومتنوعة من مركبات الايض الثانوي ( السموم الفطرية والمضادات الحيوية) (Khan واخرون ، 2020 وMing وآخرون ،2012) تنتج انواع *Trichoderma* spp عدداً كبيراً من منتجات الايض الثانوي في محيطها مع الحد الأدنى من الاحتياجات الغذائية ويمكن استخدام هذه المواد في الزراعة والصناعة والفوائد الطبية وبالتالي فهي مهمة للإنسان وهناك عده انواع منها تظهر نشاطا ملحوظا مضاداً للمسببات المرضية الفطريه للنباتات(Vizcainoواخرون ، 2005 ) حيث تنتج مجموعة متنوعة من مركبات الايض الثانوي مثل pyrones و gliotoxinو gliovirin و peptaibols (Vinaleواخرون ،2008 ) وفي دراسات سابقة بينت قدرة انواع الفطر *Trichoderma* spp على استعمار منطقة القريبةِ من الجذور حيث تكون حاجزاً واقياً حول الجذور والذي بدوره يعمل على منع وصول المسببات المرضية إلى الجذر اذ تفرز هذه الفطريات عدداً كبيراً من منتجات الايض الثانوي مثل (البتيدات غير رايبوسومية ،التربينويدات ،البيرونات ، مركبات مشتقه من الاندوليك ،وتعمل هذه المركبات على زياده تفرع الجذور وتعمل على زيادة الكتلة الحيوية للنبات ( Harman، 2000 و Cotreras وآخرون ،2016 )

كذلك لـه القدرة علـى إنتـاج البتيـدات والبروتينـات والانزيمـات وبعـض المركبـات ذات الـوزن الجزئي المنخفض والتي تعمل على تحفيز الآليات الدفاعية في النباتات مما ينتج عنها زياده في إنتاج مركبات الكحول ،الفينولات التي تعمل على تثبيط المسببات المرضية (Reino وآخرون، 2008 و Bisen وآخرون ،2016 ) كذلك تعمل على زيادة في إنتاج البروتينات من قبل الفطر *Trichoderma* spp عند التحسس بوجود مسببات مرضية وتعمل هذه البروتينات على زياده الوسائل الدفاعية ضد مسببات الأمراض (Saenz-Mata وJimenez-Bremont ،2012) كذلك وجد بان *Trichoderma* spp يعمل على زياده فعاليةِ انزيم Cellulase،Peroxidase التي تعمل على زيادة وتحفيز المقاومة الجهازية في نبات اللوبيا ضد المسبب المرضي *Macrophomana.phaseolina* .( نهال ،2011)

كما تنتج عزلات *Trichoderma* spp سلسله من مركبات الايض الثانوي تسمى Koninginins (A-G) منها الأنواع B،A في الوسط السائل لسلالة *T.koningii* حيث تم الحصول عليها من التربة والجذور (Cutler واخرون ،1989، 1999) كذلك تم عزل سلالتين من *T.harizinum* من جذور الحنطة اظهرت بأنها لها القدرة على انتاج نوعين B،A في مزارعها السائلة (Almassi واخرون ،1991) وتم عزل نوعين أخرين هما Koninginins D،C من *T.koningii* المعزولة من التربة على وسط الحنطة (Dunlop واخرون ،1989 و Parker واخرون ،1995) كذلك تم عزل Koninginins E من الوسط السائل *T.harizinum* و*T.koningii* (Ghisalberti و Rowland ،1993 و Parker واخرون ، 1995) وعزل النوع .G من *T.aureoviride* (Cutler واخرون ، 1999) وتكون هذه المواد نشطه أحيائياً ضد مسببات الأمراض النباتية الفطرية المختلفة (Ghisalberti و Rowland ،1993) حيث أظهر نوع D نشاطاً مضاداً للعديد من الفطريات المسببة للأمراض النباتية مثل. *Bipolaris sorokiniano* ،*P. middletonii* ،*P.cinnamomi*، *F.oxysporum* (Dunlop واخرون ،1989) وفي دراسة اخرى اظهر كل من D،B،A المعزولة من *T.koningii* نشاط مضاداً عالياً ضد الفطريات *F.oxysporum*، *F.solani* ،*A. panax* (Chen واخرون ،2015)

## 2-4-2 السم الفطري Trichodermin

لقد تم الكشف Trichodermin لأول مره عام 1960 وتم تصويرة بشكل كامل بواسطة NMR و X-ray في راشح الفطر *T.viride* (Godtfreddesn و Vangedal، 1965) و تمت دراسة المسار الحيوي لتخليق هذا السم Trichodermin في *Trichoderma* spp حيث تم الكشف عن tri 5 gen المسؤول عن انتاج Trichodermin والذي ادى الزيادة في التعبير عنه الى زيادة النشاط المضاد للفطريات في الفطر*T. bervicompactum* (Tijerino واخرون ،2011) ولقد تم الكشف عن مركبين مختلفين من Trichothecenes في انواع *Trichoderma spp* هما Trichodermin و HA التي تم الكشف عنها في راشح الفطرين *T. bervicompactum* و *T.arundinaceum* اذ تم الفصل بين هذين المركبين بعد ما كان يعتقد نفس المركب (Corley واخرون ، 1994 و Cardoza واخرون ،2011) يعتبر Trichodermin واحداً من عائلة مركبات sesquiterpenoid المستقلبات التي تمتلك مجموعه (Olefinci) في الموقع C10-C9 ومجموعة (epoxide) بين C12-C13 على هيكل trichothecene الذي يعرف ويوصف ب 12-13epoxide (Godtfredsen و Vangedal ، 1965)



الشكل (2) التركيب الكيميائي للسم Trichodermin

كما يمتلك هذا السم القدرة على الا نتشار بسرعة عبر جدار الخلية ويرتبط بالرايبوسوم حقيقية النواة لمنع ترجمة البروتينات عن طريق التفاعل مع ناقل البيبتيديل (Westerbergواخرون ،1976) وفي دراسة سابقة اظهر المركب Trichodermin قدرة تضادية ضد الفطريات الخيطية والخمائر والبكتريا وفي دراسة اخرى من الناحية الاحيائية اظهر

قدرة تضاد للملاريا (Tijerino واخرون ، 2011) وضد الفايروسات (Garcia واخرون 2002) وكمبيدات للحشرات (Cole وCox ،2002) .

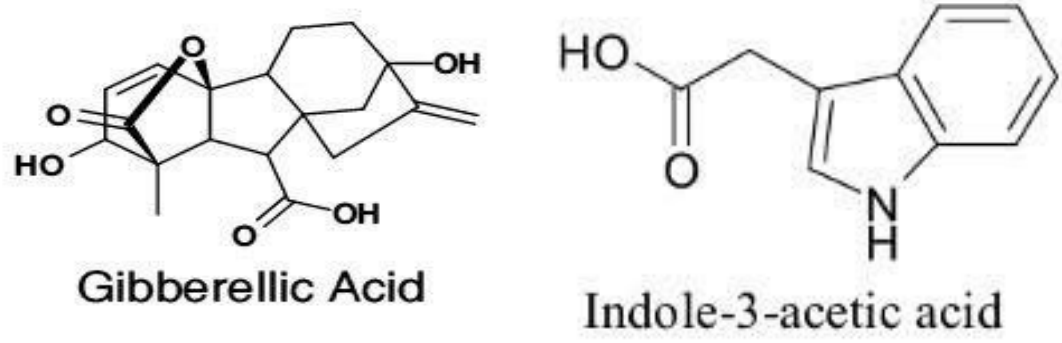
كما لوحظ ان راشح الفطر *T.koningiopsis* يحتوي على مواد مضادة في مستخلص الايثل اسيتات مع مثبطات للميكروبات و بعد عملية الكشف والتشخيص من خلال TLC و H-NMR و C-NMR تم تحديد المركب Trichodermin الذي اظهر نشاطاً مميتاً للفطريات، كما اظهر قدرة تضادية عالية ضد *A.fumigatus* ،*P.oryzae* ،*B. Cinera* مع MIC (31.25) مايكرو \مل (Sahar وDoustmorad، 2018) وعزل Trichodermin من الفطريات *T.bervieocompactum* ،*T.viride* ،*T.harzianum* ،*T.longibrachiatum* ،*T.koningiopsis* ويعتقد ان السم الفطري Trichodermin ممكن استخدامه في علاجات السرطان (Godtfredsen و Vangedal ،1964 و Watts، واخرون ، 1988 و Nielsen واخرون ،1998 ،2005 و Reino واخرون ، 2008 و Yang واخرون ، 2010 و Tijerino واخرون ، 2011)

والسم Trichodermin كان المركب المضاد للفطريات الأكثر دراسة (Jin واخرون 2007 و Degenkolb واخرون ، 2008) اذ تم الحصول عليه من *T. brevicompactum* وعرض نشاط مثبط كبير على *R. solani* و *B. cinerea* و *Colletotrichum lindemuthianum* (Shentu واخرون ،2014). تم عزله أيضًا من *T. harzianum* وأظهر أنشطة مضادة للعديد من الفطريات الممرضة للنبات مثل *Cochliobolus miyabeanus* ، *R. solani* ، *C. lindemuthianum* ، *Fusarium oxysporum* ، *Thanatephorus cucumeris* و *Colletotrichum gloeosporioides* و *B. cinerea* (Shi وShentu، 2009 و Sha واخرون ، 2013) وفي دراسة اخرى تم الكشف عن هذا السم الفطري في عزلة *Trichoderma* spp واختبر تأثيره على ثلاث انواع من النيماتودا اذ اظهر نسبة قتل 95% على كلا النوعين*Panagrellus redivivus* و *Caenorhabditis elegans* خلال 72 ساعة وبتركيز 400 ملجم \التر بينما حقق نسبة 54.2% على *Bursaphelenchus xylophilus* (Yangواخرون ، 2010)

## 5-2 إنتاج منظمات النمو في عزلات *Trichoderma* spp و تعزيز نمو النبات

منظمات النمو عبارة عن مواد عضوية تنتج بشكل طبيعي في النباتات الراقية حيث تعمل على التحكم في النمو والعمليات الفسيولوجية الأخرى وتكون ذات قدرة على التأثير في الاتصال بين

الخلايا بكميات قليلة جدا(Ma واخرون ،2008) توجد هناك خمسة انواع من منظمات النمو في النباتات وهي (الجبرلينات،الاوكسينات ،السايتوكاينينات ،الاثلين ،حامض abscisic Acid ) وقد بين Rodrigues واخرون( 2009 ) أن اندول حامض الخليك من أهم الاوكسينات الذي اكتشف أول مرة في راشح الفطر *Rhizopus sunias* حتى قبل اكتشافه في النباتات ،كذلك يعد الجبرلين $GA_3$ من أهم الجبرلينات الذي يؤدي دوراً مهماً في نمو النبات ،ويكون واسعَ الاستخدام في الزراعة في المشاتل وزراعة الأنسجة (Shukla واخرون ، 2005) ويعد من أهم منظمات النمو النباتية من الناحية الاقتصادية والصناعية ( Bandelier وآخرون ،1997) ويعتبر $GA_3$ من المنتجات التي تلعب دوراً حيوياً ومهماً والتي من الممكن أنَّ تنتج من الفطريات وتستخدم في الصناعة والزراعة البستنية وتعتبر من مركبات الايض الثانوي في الفطريات ، اذ قام الباحث T.yabut بعزل الـ GA3 من فطر *G.fujikurai* (Hasan، 2002 ) و تم تسجيل 52-57 نوع من الجبرلينات وكذلك تم عزل العديد من المركبات من مختلف الفطريات كمنظمات نمو ،في حين أنَّ القليل منها أعطى نتائجاً جيدة في التأثير على النمو ،أن الجبرلينات المختلفة تسهم في زيادة وتطور عمليات نمو انبات البذور واستطالة الساق و التزهير وتطور الثمار( Nakamara ، 2004 ) إن عزلات *Trichoderma* spp لها قابلية على إنتاج السايتوكايتنين مثل Zatin والجبرلين GA3، وبين أن السيطرة على إنتاج هذه المركبات يعمل على زياده جودة الاسمدة الحيوية وزيادة المنتج وكذلك تحاكي انتاج الهرمونات النباتية (Osiewacz، 2002)




**الشكل (3) التركيب الكيميائي لمنظمات النمو IAA و GA3**

ويعد Windhamواخرون (1986) اول من اقترح إلية تعزيز النمو في النبات بواسطة الفطريات . وفي دراسة سابقة بينت أن معاملة تربة الحقل المزروع بمحصول الطماطة بالفطر *T.viride* أدى إلى زيادة في نمو النبات بشكل معنوي (قاسم وآخرون ،1987) وكذلك وجد ان

بعض عزلات *T.harzianum* تعمل على اختزال المدة الزمنية للانبات وكذلك تزيد من نسبة انبات البذور في النارنج .حيث أطلق Barker(1989) عليها مصطلح محفزات النمو phytostimalater . وذكر chang وآخرون (1986) أن التبكير في الانبات في بذور الفلفل وزهرة الاقحوان و زيادة الطول والوزن الجاف لكليهما يعود إلى إفراز مواد شبيه بمنظمات النمو حيث أدت معاملة عقل زهرة الاقحوان بعالق ابواغ الفطر*T .harzianum* الى زيادة في عدد وحدات الكالس في قاعده العقد ونسبه التجذير للعقل وكذلك وجد أن لبعض عزلات الفطر *T.harzianum* دوراً مهماً في تحفيز نمو النبات وإنتاج منظمات النمو النباتية والتي تعمل مع أليات أخرى منها زيادة جاهزية وامتصاص العناصر المغذية للنبات (Phuwiwat. واخرون ،2001)

حيث أشارت العديد من الدراسات مقدرة الاحياء المجهرية على إنتاج منظمات النمو ومنها الجبرلينات الاوكسينات وتعتبر الجبرلينات نموذجاً لمواد الايض الثانوي في الأحياء المجهرية وهناك 126 نوع من الجبرلينات تم تمييزها في النباتات والفطريات والبكتريا ( Taiz و Zaiger،2002) حيث تمتلك بعض عزلات الفطر *Trichoderma spp* القدرة على إنتاج منظمات النمو النباتية فقد تم الحصول على حامض الجبرليك والاوكسين مختبريا من ثلاثة عزلات محلية من الفطر *T.harzianam* غير أنه اختلفت من حيث قابليتها على إنتاج المنظمين معا فقد تفوقت العزلة T9 في إنتاج حامض الجبرليك في حين سجلت العزله T26 تفوقاً معنوياً في إنتاج الاوكسين (عبود وآخرون ،2008)

## 6-2 التقدير الكمي لحامض الجبرلين$GA_3$ واندول حامض الخليك IAA

تختلف طرق قياس وتقدير كل من حامض الجبرلين و اندول حامض الخليك والتى تعتمد بشكل أساسي على قياس مدى تأثيرها في نمو اجزاء النباتات المختلفة حيث استخدم طرق الحيوية للقياس والتقدير ولكن هذه الطريقة تحتاج إلى خبرات وتخصص عالي لذلك كان هناك طرقٌ أخرى للقياس والتقدير منها Colour imetric،Spectrophotomatri ، fluorimetric وهذه الطرق تحتاج إلى استخلاص وتنقية الوسط السائل وذلك بعدة معاملات واضافات للوسط لتخلص من المواد العالقة (Berrios وآخرون ،2004) وتعد طريقة Colour imetric من الطرق واسعة الاستخدام للقياس الكمي للاوكسين IAA في الأوساط السائلة والذي اقترحها وعدل عليها بعض الباحثين ،ولعل أبرزهم Gorodon و Weber (1951) وتكون مهمه لقياس الكثير من النماذج خلال وقت واحد وكذلك عند التراكيز الواطئة أو عند دراسة الاختلافات في

التراكيز القليلة في الوحدات التجريبية حيث تتم هذه الطريقة قراءه النماذج بعد 25 دقيقة من اضافة الكاشف Fe-HCIO4 وذلك باستعمال جهاز UV Spectrophotometer عند 530 نانومتر كما وتعد طريقة Spectrophotomatric المقترحة من Holbrook وآخرون (1961) واحدة من الطرق التي تتميز بكونها واسعة الانتشار ، تكون بسيطة لتقدير GA3 في دراسة الأوساط السائلة والتي تتم بإضافة HCl إلى الأنموذج وبعد ذلك يترك ل 75 دقيقة ومن ثم قراءته لـUV Spectrophotometer عند 254 نانومتر .

## 7-2 التصنيع الحيوي لمستحضر الفطر *Trichoderma* spp

### 1-7-2 الاوساط التخمرية والمواد الحاملة المستعملة في تنمية واكثار فطر المقاومة الاحيائية

أنَّ من الامور التي اثرت على الاستخدام الواسع لعوامل المكافحة الاحيائية والتي كان لها الدور الكبير في نجاح او فشل عامل المكافحة هو اختيار الوسط الامثل لغرض اكثار وتنميه الفطر عليه الذي يمتلك عدة صفات منها متوفر رخيص الثمن امن متوازن ويعتبر العالم wells وزملائه ( 1972) اول من حمل الفطر *Trichoderma* sp على بذور الشيلم والتربة المعقمة لغرض مقاومة الفطريات ونشره في الحقل . كما استعمل عدداً كبيراً من الاوساط منها (السماد الحيواني ،قش الحنطة ،نشارة الخشب وقش الشعير ،الدخن ،نخالة الرز ،الحنطة ، واوراق الصحف، بذور السلجم والمولاس ، حبوب العائلة البقولية لتنمية الفطر (طه ، 1990 و Wolffhechel و Funek، 1992 و Paningbatam،1997 و سعد ، 2001 و المالكي ، 2002) وقد بينت الدراسات السابقة الى ان القدرة التطفلية للفطر الاحيائي تختلف حسب نوع الوسط الغذائي (Mukerji وGarg، 1987) .

كما بين حمد (2002) أنَّ وسط النشا مع فول الصويا بالتساوي هو الوسط الامثل والاكفأ في سرعة النمو وتكوين الابواغ الكونيدية ، ولتلافي حدوث التلوث بالفطريات الهوائية والبكتريا يسخن الوسط الغذائي على نار هادئة لمدة خمسة دقائق ثم يصب في الاطباق بأقل سمك ومن ثم تعقيمه وتلقيحه بالفطر ، كما استخدمت مخلفات حيوانية مختلفة ومخلفات الدواجن في تنمية الفطر وكانت الاخيرة افضلها (المالكي ، 2002) وقد اظهرت نتائج دراسة استخدمت فيها خمسة انواع من اوساط التحميل وهي قش الحنطة وقشور الرز والشيلم والسماد العضوي (فضلات الاغنام) وتربة مزيجية ، وكان اكثرها ملاءمة للفطر *T.harzianum* ، هو السماد العضوي الذي بلغت فيه الكثافة العددية ( حمودي ، 1999 و المالكي ، 2002.)

## 2-7-2 أشكال تجهيز المستحضرات الاحيائية :

التراكيب التي تجهز فيها المبيدات الاحيائية تكون عادة بعدة انواع فمنها السائلة ومنها الصلبة وقد قسمت الى منتجات جافة (غبار تعفير ، مسحوق قابل للبل ، حبيبات) ومنتجات كعوالق (قواعد ماء وزيوت مستحلبة) وتشير المصادر الى ان معظم المساحيق القابلة للبلل تحوي على 50-80% مسحوق صناعي و 15-45% مواد مالئة غير فعالة محبة للماء مثل السليكا و الطين واللاكتوز وغيرها ، وتحوي على 1-10% مشتتات تعمل لابقاء الجزيئات معلقة بعمود الماء و 3-5% مواد مانعة للتكتل يجب ان يكون التركيب الناجح لأي مبيد احيائي متصفاً بالفعالية وانخفاض الكلفة ، وان يكون عملياً ضمن الظروف البيئية (Burges و Keitth ، 1998)ولم توفر المصادر أي معلومات صريحة عن نوع ونسب المواد الداخلة في أي تركيب مما تنتجه بعض الشركات من المبيدات الاحيائية للفطر *T.harzianum* ، وقد لخص Harman (1991) مواصفات الكتلة الاحيائية Biomass لأي عامل احيائي يستعمل في المكافحة الاحيائية

الكتلة الحية يجب ان تحتوي على تراكيب احيائية مناسبة وبكمية كافية. علما أنَّ انتاج الكتلة الحية يجب ان يكون اقتصادياً وغير مكلفاً ويفضل الوسط السائل على الوسط الصلب ،الكتلة الحية المحضرة بالطريقة السائلة عادة ما يتطلب انتاجها مواداً صلبة مضافاً لها القليل من الماء أي أنها تحتوي على مستوى رطوبي معين، ينبغي ان تحتوي على نسبة عالية من الوحدات التكاثرية القادرة على الانبات والتأثير بفاعلية، الكتلة الحية يجب ان تكون لها القدرة على البقاء لمدة طويلة وتتحمل فترة خزن طويلة، لذا إنّه من الصعوبة إنَّ تتواجد هذه الصفات جميعها في كائن معين و لكن يجب ان تمتلك الاحياء المستخدمة اغلب هذه المواصفات ، وهذا ما يتوفر في الفطر *T.harzianum* ، اذ تضاف للتربة كميات كبيرة من لقاحه لغرض السيطرة الاحيائية على مسببات الامراض النباتية(Baker و Cook ، 1974).

ونظراً للميزات التي يتمتع بها الفطر *Trichodrema* spp ولما اثبته من قابلية في التغلب على كثير من الامراض النباتية ، قامت بعض الشركات العالمية المصنعة للمبيدات بانتاج مستحضرات تجارية يدخل الفطر *Trichoderma* spp كوحدة اساسية في تركيبها اما بشكل ابواغ كونيدية اوغزل فطري (Whipps ، 1997 و Fravel وآخرون ،1998)

## 2-8 استخدام التقانات الجزيئية في تشخيص الفطريات

هي إحدى التقنيات المعتمدة وتكون تطبيقاتها واسعة الاستخدام في علم الاحياء الجزيئي حيث أن التفاعل التنظيمي مختبريا يعمل على تضاعف جزء معين من DNA وبأختلاف كمياته حيث تصل إلى (مايكوغرام) من ال DNA المستخدم يمكن لأي حمض من الأحماض النووية أن يعدل أو يستنسخ أو يحلل .وكذلك يمكن الكشف عن السلاسل النادرة بواسطة التضخيم بأستعمال تقنية Polymerase Chain Reaction التي يمكن تعريف بانها عمليه يمكن من خلالها مضاعفة مواقع معينة من الحمض النووي DNA وذلك باستخدام عدة عوامل منها (بادئات عشوائية او متخصصة ،انزيم البلمرة، درجة حرارة مناسبة ) و تنتج حزم متعددة متضاعفة تكون غير متشابهة في الأوزان الجزئية (Williams وآخرون ، 1990)

أنَّ التنميط الوراثي Genotyping بأستخدام نواتج التفاعل PCR يمكن تحديد درجة التشابه والاختلاف الوراثي على مستويات تصنيفة وراثية بين الفطريات ، كان تشخيص وتصنيف الأنواع والسلالات الفطرية محل اهتمام العلماء دائمًا ، لذلك كان الفكر هو إيجاد نظام تصنيف متقدم أو رمز عالمي مثل DNA barcoding ، والذي يمثل تصنيفًا سهلًا وسريعًا ، الطريقة التي تستخدم Short gentetic marker داخل جينوم الكائن الحي (Chu ، 2006. وآخرون) حاليًا تم استخدام منطقة ITS في دراسات التصنيف الجيني ، وهي سلسلة من القواعد النيتروجينية على الحمض النووي الرايبوزي للجين (rDNA). تلعب هذه المنطقة دورًا مهمًا وحاسمًا في تطوير وظيفة rDNA (lwen واخرون ، 2002)

تم اعتماد التباين في تسلسل المناطق الشكل (2) ITS داخل الجين للفطريات المختلفة في التشخيص على أنها مناطقَ تصنيفية استراتيجية ،كان لاكتشاف منطقة (ITS ) في (DNA) الفطريات دور كبير في ظهور طريقة دقيقة وسريعة لتشخيص الفطريات على مستوى الانواع والسلالات وكذلك طور في عملية دراسة وفهم العلاقات التطورية وكيفية نشوء الانواع والسلالات الجديدة ،لقد تم التعرف على العديد من مناطق (ITS) في DNA والتي عدت كشفرات وراثية Universal fungal barcode لتمييز بين الفطريات . (Conrad واخرون، 2012) وفي دراسة أجريت في بولندا لتقييم التنوع الجغرافي لفطر *Trichoderma* spp اذ استخدم 170 عزلة تم عزلها من أكثر من 50 منطقة مختلفة وقد بينت الدراسة نتائج التضخيم لمناطق ITS باستخدام زوج من البادئ ITS1و ITS 2 كفاءة عالية في استخدام هذه الشفرة الجينية في تشخيص وتمييز الدقيق للانواع المختلفة لجنس *Trichoderma spp* (Blaszczyket وآخرون ، 2011)

## 9-2 قواعد البيانات البيولوجية National Center for Biotechnology Information (NCBI) وبرنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

لقد اصبحت قواعد البيانات البيولوجية اكثر تطوراً لتمثل مكتبات للبيانات علوم الحياة الجينية، حيث اصبحت هناك مصادر متعددة لهذة البيانات منها البحوث المنشورة والتجارب العلمية والتقنيات المتقدمة ، حيث يعتبر GenBank من اكبر واهم قواعد البيانات البيولوجية المتوفرة، الذي يمتلك تتابع الحامض النووي المتاح للابحاث على مختلف الكائنات الحية المعلومات والبيانات في Gen Bank يتم تحديثها كل 15 شهراً (Sanders وMiller ، 2010) حيث يتم تزويد بنك الجينات بالبيانات للقواعد النايتروجينية ،تتم عملية تعاون بين مراكز دولية تعود الى دول مختلفة تشمل (NCBI) ومختبر علم الاحياء الجزئي الاوربي (EMBL) وبنك البيانات للحامض النووي الياباني (DDBJ) حيث يتم في هذه المراكز تحديث لبيانات كل 24 ساعة وتوزع بين قواعد البيانات وهي بذلك تكون مصدراً موحداً للبيانات .

يعد برنامج BLAST-NCBI احد الادوات التيي يتم من خلالها البحث عن قواعد البيانات الواسعة المتاحة مثل Gen Bank الذي يعطي مقارنة بين العزلات المطلوبة والعزلات المتشابهه معها (NCBI) كما يعتبر من البرامج البحثية الخاصة بتطبيقات قواعد البيانات في معادلات خوارزمية تمثل تعاقب الحامض النووي (Benson ،2005).

## 10-2 الشجرة الوراثية Phylogentic Tree واستخدامها في الكشف الجزيئي عن العلاقة الوراثية بين العزلات الفطرية

الشجرة التطورية او ما تسمى بشجرة القرابة Phylogentic Tree حيث تستخدم لدراسة علاقة النشوء وتاريخ تطور واصول الكائنات الحية وذلك من خلال رسم العلاقات بين الانواع وتوضح فيما اذا كانت بعض الصفات متماثلة وموجودة في احد الاسلاف المشتركة نتيجة لقيود او تطورات متباينة او تكون متماثلة ولكنها لا توجد في سلف مشترك وانما كانت ناتجة عن تطورات وظيفية ويتم رسم شجرة القرابة بالاعتماد على متواليات حسابية وكذلك البرامج التي تشارك في رسم وتحليل النشوء والتطور .ومن بين هذه البرامج يمكن استخدام برنامج( Moleculer Evolntionary Genetics Analysis) لرسم شجرة النشوء والتطور

بالاعتماد على الطرق المعتمدة على مصفوفات المسافات مثل طريقة ضم الجوار و باقصى قدر من الاحتمالية (Tumura واخرون ، 2013) .

## 11-2 مرض تعفن وموت بادرات الباميا

تكمن خطورة وشدة الفطريات الممرضة للنبات في فطريات التربة الممرضة للنبات Soil –borne plant pathogens، كون هذه الفطريات غير مرئية للإنسان بحكم وجودها وعادةً ما تظهر اعراضها المرضية بشكل واضح على المجموع الخضري للنباتات المصابة بها بعد تمكنها من القضاء على المجموع الجذري (Garrett، 1970 و Agrios، 2005) ان الفطريات *Rhizoctonia.solani* و *Fusarium solani* و*M.phaseolin* من اهم المسببات المرضية لامراض تعفن الجذور و موت البادرات ، كذلك تم عزل الفطريين *Macrophomina phaseolina* و *Rhizoctoniasolani* كمسببات مرضية لامراض تعفن الجذور (وناس،2012 ، الخفاجي،2012 ) كذلك تم عزل ستة اجناس فطرية مرافقة لجذور نباتات الباميا المتدهورة وبنسب ظهور متباينة وهي *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* و *Macrophomina phaseolina* و*Pythium sp.* و *Mucor sp.* و *Aspergillus sp.* وبلغت اعلى نسبة ظهور 58% للفطر *Fusarium solani* ( راضي ،2018) الفطر *F. solani* احد الفطريات الاربعة المسببة لتعفن بذور وموت نباتات الباميا اذ عزلها من جذور النباتات المصابة الفطريات *F.solani* و *Rhizoctonia saloni* و *Pythium aphanidermatum* و *Macrophominaphaseolina* . وجد كريم ( 2012 ) ان الفطريات المسببة لتعفن جذور الباميا في محافظة بابل هي *Rhizoctonia solani* و *Fusarium solani* و*Macrophomina phaseolina*. اوضح Ahamdi واخرون (2012) بان الفطر *F.solani* هو الفطر المسؤول عن مرض تعفن الجذور على نبات الباميا في باكستان، واكدت دراسة في باكستان Afzal وآخرون (2013) أن الفطريات المحمولة في التربة كفطر *F.solani* و *F.oxysporum* و *M.phaseolina* و *R.solani* هي المسببات الرئيسة لامراض تعفن جذور الباميا أذ تصيب الجذور وتسبب تعفن الجذور مما يؤدي الى تدهور النباتات و من ثم موتها. وجد Ali وآخرون ( 2013 ) خمس عزلات فطرية من الفطر *F.solani* مختلفة من ناحية لون المستعمرة وسرعة نموها وكان لهذه العزلات الفطرية الدور البالغ في احداث الاصابة لنباتات الباميا بمرض تعفن الجذور . كما وجد Aguiar واخرون (2013) أن مرض ذبول الباميا ناتج عن اصابة جذور نباتات الباميا بالفطر *F.oxysporum* مما يعمل على تدمير المجموع الجذري وموت النبات ،تمكن الباحثان Saseetharan

وZakaria (2014) من عزل عدة انواع من جنس الفطر *Fusarium* المسببة لتعفن انسجة عدد من المحاصيل الخضر كمحصول الباميا والطماطة والخيار و الفاصوليا ومن اهم الانواع التي تم عزلها *F.oxysporum* و *F. solani* و *F.proliferation* و *F.semitectum* وكان لهذه الفطريات الدور البالغ في إحداث امراضية التعفن للانسجة في جميع محاصيل الخضر ومن اهمها محصول الباميا.

# 3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

## 3-1 الاجهزة والادوات والمواد المستخدمة في الدراسة

استعملت في هذه الدراسة مجموع من الاجهزة والادوات المختلفة جدول1 في اجراء التجارب الخاصة بهذه الدراسة . وكذلك مجموع من المواد الكيميائية المستخدمة جدول 2 في تنفيذ الدراسة المختبرية . بينما استخدمت في هذه الدراسة أوساط زرعية مختلفة لعزل الفطريات وتنميتها وتشخيصها جدول3 وكذلك لغرض أجراء التجارب الخاصة بها . والتي تم عزل مجموعة كبيرة منها الفطريات المستخدمة في تنفيذ التجارب جدول 4

**جدول (1) الأجهزة والادوات المستخدمة في أجراء التجارب الواردة في البحث**

| ت | الجهاز | الشركة المصنعة | المنشأ |
|---|---|---|---|
| 1 | جهاز التعقيم البخاري Autoclave | Tom | Japan |
| 2 | الحاضنة Incubator | Memmert | Germany |
| 3 | مجهرضوئي مركب | Olympus | Japan |
| 4 | ثلاجة Refrigerater | Concord | France |
| 5 | Centrifuge | Hettich | Germany |
| 6 | اطباق بتري Petri Dishes | Afco | Jordan |
| 7 | U.V.Spectrophotomater | Cleaver | England |
| 8 | مصباح بنزن Burner | -* | Iraq |
| 9 | ميزان حساس Sensitive Balance | Denver Instrument | Germany |
| 10 | شرائح زجاجية واغطيتها Slides andCover Slides | China Mheco | China |
| 11 | أوراق ترشيح Filter paper | BioBasic Inc. | Korea |
| 12 | دوارق زجاجية Flasks | Volac | England |
| 13 | ثاقب الفلين Cork Borer | * | India |
| 14 | غرفة العزل Hood | Tianjin Taisite | China |
| 15 | انابيب اختبار Test tubes | * | China |
| 16 | سحاحة Burette | * | China |
| 17 | ماصات مختلفة الاحجام Pipettes | Huma pette | Germany |
| 18 | PH- meter | * | * |
| 19 | Conductivity Meter | * | * |

*تعني الجهاز لا يحمل اسم الشركة المصنعة

**جدول (2) المواد الكيميائية المستعملة في إجراء التجارب الواردة في هذه الدراسة**

| ت | المواد الكيميائية | الشركة المصنعة |
|---|---|---|
| **1** | خلات الأثيل | Belgium |
| 2 | HCI | INDIA |
| 3 | Puffer phosphat | INDIA |
| 4 | مادة القياسية GA3 | INDIA |
| 5 | مادة القياسية IAA | INDIA |
| 7 | ايثانول absolute | SPAIN |
| 8 | ديكرومات البوتاسيوم | *** |
| 9 | حامض الكبريتك | *** |
| 10 | سلفات الفضة | *** |
| 11 | داي فينل امين | *** |
| 12 | سلفات الحديد | *** |
| 13 | كاشف Salkowski | *** |

**جدول (3 )الاوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة**

| ت | الوسط الزرعي | الشـركة المصنعـــة | الغرض من استخدامه |
|---|---|---|---|
| 1 | وسط البطاطا دكستروز آكار Potato Dextrose Agar (P.D.A.) الجاهز | India-Himedia | لعزل وتنمية وتشخيص الفطريات |
| 2 | وسط الآكار المائي Water Agar (W.A.) | India-Himedia | لمعرفة أمراضية الفطريات |
| 3 | وسط البطاطا سكروز السائل Potato Sucrose Broth (P.D.B.) | يحضر مختبريا | للحصول على العالق الفطري |
| 4 | وسط البطاطا سكروز اكار Potato Sucrose Agar (P.D.A.) | يحضر مختبريا | لتنمية الفطريات |
| 5 | وسط نخالة الحنطة | يحضر مختبريا | اكثاروتحميل الفطريات |

**جدول (4) جميع الفطريات المستخدمة بالدراسة**

| ت | الفطريات | مكان العزل او مكان الحصول عليه |
|---|---|---|
| 1 | *Trichoderma* spp | 42عزلة تم عزلها من الترب المحيطة بجذور نباتات سليمة مختلفة |
| 2 | *Alternaria* sp | جذور وسيقان نباتات الباميا مصابة |
| 3 | *M.phasolinai* | جذور نباتات الباميا مصابة |
| 4 | *Fusarium* sp | جذور نباتات الباميا مصابة |

## 2-3 تحضيرالأوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص وتنمية الفطريات

استعملت في هذه الدراسة أوساط زرعيه مختلفة لعزل الفطريات وتنميتها وتشخيصها وكذلك لغرض أجراء التجارب الخاصة بها وكما يأتي :

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

حضر الوسط بأخذ 200 غم من درنات البطاطا المقشرة والمقطعة الى قطع صغيرة وغليها بالماء المقطر بحجم 500 سم$^3$ لمدة 20 -30 دقيقة في دورق زجاجي وبعد انتهاء 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 اليها راشح البطاطا واكمل الحجم الى 1 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 لتبرد ، ثم صب الوسط في اطباق بتري حسب التجربة المطلوبة او حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

### 2-2-3 وسط البطاطا دكستروز آكار الجاهزPotato Dextrose Agar (PDA)

حضر بإذابة 39 غم في (1) 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 لتبرد ، ثم صب الوسط في الأطباق البترية حسب التجربة المطلوبة

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

حضر باذابة 17 غم من الاكار في (1) 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 لتبرد 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 لتبرد ، ثم صب الوسط في انابيب اختبار خاصة حسب التجربة المطلوبة و حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

### 5-2-3 وسط نخالة الحنطة

اخذ 2 كغم رطب بالماء وزع في عدد من الدوارق وغلقت باحكام وعقمت بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدّة التعقيم تركت الدوارق لتبرد

## 3-3 جمع العينات

تم جمع عينات التربة من تربة مزروع فيها نباتات سليمة لعزل انواع الفطر الاحيائي *Trichoderma spp* بينما تم جمع عينات نباتات الباميا المصابة لعزل الفطريات الممرضة المختلفة المستخدمة في الدراسة

### 1-3-3 جمع عينات التربة .

تم جمع عينات التربة من عدد من محافظات العراق كربلاء ، بغداد ، نجف ، ديوانية ،بابل , ناصرية ، كركوك ، موصل ، ديالى ،المثنى ، من منطقة الرايزوسفير لمجموعة من النباتات السليمة ووضعت في أكياس نايلون ونقلت الى المختبر لأجراء الدراسة عليها بعد تثبيت كل البيانات عليها من تاريخ الجمع واسم النبات والمنطقة وغيرها جدول 5 . وتم جمع العينات ابتداء من تاريخ 2020/8/28 الى 2021 /1/5 .

**جدول (5):رموز العينات ومكان جمعها ونوع النباتات التي جمعت بالقرب من جذورها.**

| ت | المحافظة | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | البيانات | كربلاء | بابل | ديوانية | نجف | بغداد | ناصرية | كركوك | موصل | ديالى | المثنى |
| | رمز العينة | K1 | H1 | D1 | N1 | B1 | S1 | R1 | M1 | E1 | A1 |
| 1 | مكان الجمع | المركز | حي الشهداء | غماس | حي الأمير | شارع فلسطين | الهنية | القلعة | برطلة | ناحية مندي | الرميثة |
| | اسم النبات | حمضيات | حمضيات | نخيل | السدر | ياس | شعير | نارنج | كالبتوز | كالبتوز | شعير |
| | رمز العينة | K2 | H2 | D2 | N2 | B2 | S2 | R2 | M2 | E2 | A2 |
| 2 | مكان الجمع | طويريج | الطهماز ية | مركز | العسكري | شارع فلسطين | ستة كيلو | الصالحي | الشورة | كنعان | المركز |
| | اسم النبات | حمضيات | خضر | اكاسيا | السدر | ختمة | شعير | حمضيات | نبات زينة | كالبتوز | ورد جوري |
| | رمز العينة | K3 | H3 | D3 | N3 | B3 | S3 | R3 | M3 | E3 | A3 |
| 3 | مكان الجمع | مزرعة فدك | أبو غرق | سيد طالب | الحيدرية | محمودية | المسافر | الدبس | حمام العليل | امام منصور | الرميثة |
| | اسم النبات | رمان | خضر | ذرة بيضاء | اكاسيا | باذنجان | ماش | برتقال | صنوبر | حنطة | بصل |
| | رمز العينة | K4 | H4 | D4 | N4 | B4 | S4 | R4 | M4 | E4 | A4 |
| 4 | مكان الجمع | عين التمر | لهناوية | جامعة القادسية | عباسية | بياع | المهنة | بشير | بيجي | الدهلكية | الرميثة |
| | اسم النبات | باذنجان | ذرة بيضاء | زينة | ذرة بيضاء | أشجار زينة | جت | تين | نبات زينة | صبار | عباد الشمس |
| | رمز العينة | K5 | H5 | D5 | N5 | B5 | S5 | R5 | M5 | E5 | A5 |
| 5 | مكان الجمع | حي العباس | المعمرة | الحفار | الكوفة | كرادة | ال أبو علي | شوان | القحطانية | بلدروز | الهلال |
| | اسم النبات | رمان | خضر | جت | خضر | جوري | خس | تكي | حنطة | حنطة | شعير |
| | رمز العينة | K6 | H6 | D6 | N6 | B6 | S6 | R6 | M6 | E6 | A6 |
| 6 | مكان الجمع | جمالية | القاسم | شافعية | الحيرة | منصور | قطاع 26 | امام قاسم | قضاء كلك | كنعان | الوركاء |
| | اسم النبات | خضر | خضر | باميا | باميا | شوكة عيسى | زينة | زيتون | مطاط | نخيل | شعير |
| | رمز العينة | K7 | H7 | D7 | N7 | B7 | S7 | R7 | M7 | E7 | A7 |
| 7 | مكان الجمع | وند | السدة | شامية | مشخاب | كاظمية | نهر الحسينية | قشلة | تلعفر | امام عسكر | ناحية المجد |
| | اسم النبات | رمان | مشمش | سدر | ذرة بيضاء | نارنج | خضر | نبك | شماسة | عنب | شعير |
| | رمز العينة | K8 | H8 | D8 | N8 | B8 | S8 | R8 | M8 | E8 | A8 |
| 8 | مكان الجمع | الوند | الكفل | سنية | مناذرة | بياع | السادة الغوالب | بازادي | بعشيقة | بلدروز | الرميثة |
| | اسم النبات | رمان | خضر | باميا | أشجارزينة | نبات زينة | اوليفيرا | تين | شجر معمر | نخيل | عنب |
| | رمز العينة | K9 | H9 | D9 | N9 | B9 | S9 | R9 | M9 | E9 | A9 |
| 9 | مكان الجمع | الحسينية | زيد بن علي | اطراف | مفرك الكفل | بسماية | الازايج | المصلى | برطلة | قرية الدابنة | الرميثة |
| | اسم النبات | ورد | باميا | اشجار زينة | خضر | نبات زينة | حنطة | عرموط | خوخ | تكي | جت |
| | رمز العينة | K10 | H10 | D10 | N10 | B10 | S10 | R10 | M10 | E10 | A10 |
| 10 | مكان الجمع | سياحي | المسيب | سدير | سهلة | مستنصرية | الهورة | تازة خرماتو | بعشيقة | مندلي | ناحية المجد |
| | اسم النبات | ياس | نارنج | اكاسيا | نبات زينة | نخيل | دنان | مشمش | توت | ياس | جت |

### 2-2-3 جمع العينات من نباتات الباميا المصابة لعزل الفطريات الممرضة

جمعت العينات من جذور وقواعد سيقان واوراق نباتات الباميا التي تظهر عليها اعراض الاصابة من ذبول وموت بادرات وتقزم واصفرار وغيرها من الأعراض المرضية لعدد من الحقول الزراعية في محافظة كربلاء . حيث تم قلع النبات المصاب وأخذت اجزاء من الجذور والسيقان والاوراق وضعت بأكياس وحفظت في الثلاجة لمدة 48 ساعة لحين الاستخدام لغرض عزل الفطريات .

## 4-3 العزل والتشخيص

### 1-4-3 عزل وتشخيص فطريات *Trichoderma spp* المرافقة لعينات التربة

تم عزل 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 متسلسلة ، 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. وتحريكها 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 .

### 2-4-3 عزل الفطريات الممرضة المرافقة لنباتات الباميا المصابة بموت البادرات

تم عزل الفطريات المرافقة لنباتات الباميا المصابة بتقطيع الاجزاء النباتية 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 5 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 .

## 5-3 تنقية وتشخيص الفطريات المعزولة

بعد عزل الفطريات من عينات التربة و جذور نباتات الباميا 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 الغذائي P.D.A. 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 نفسه الوسط وحضنت لمدة خمسة أيام ( Samson واخرون، 1981 ) ، فحصت المستعمرات الفطرية التي ظهرت باستخدام المجهر الضوئي المركب ثم شخصت مظهريا بالاعتماد على الصفات المظهرية والمجهرية وبأتباع المفاتيح التصنيفية التي ذكرها كل من (Leslie و Summerell ، 2006) و كذلك تم حساب النسبة المئوية لتردد عزلات الفطر الواحد بالعينات (Frequency) وفقا للمعادلات التالية :

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

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

## 6-3 حفظ العزلات الفطرية المعزولة

حفظت عزلات الفطر *Trichoderma spp* المعزولة من التربة 42 عزلة والفطريات الممرضة عشرة عزلات وهي اربع عزلات من الفطر *Fusarium* sp وثلاث عزلات *Alternaria sp* وثلاث عزلات للفطر *M.phasiolina* على وسط البطاطا P.D.A. 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 وضعت الانابيب بشكل مائل حتى التصلب لقحت الانابيب بقرص قطر 0.5 سم مأخوذ من العزلات الفطرية النقية النامية على وسط P.D.A. وبعمر سبعة 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 . وحفظها في 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 في الثلاجة لحين استخدامها .

## 7-3 اختبارات المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *Fusarium* spp و*Alternaria* spp و*M.phasiolian* مختبرياً .

تم اجراء اختبار المقدرة الامراضية باستخدام بذور اللهانة على وسط الآكار المائي لـ ثماني عزلات فطرية وهي اربع عزلات من الفطر *Fusarium* spp وثلاث عزلات من الفطر *Alternaria* spp وثلاث عزلات من الفطر *M.phasiolian* المعزولة بهذه الدراسة من نباتات الباميا وبادراتها وذلك لتقليص عددها واختيار الاكثر ضراوة منها وذلك لاستخدامها بالاختبارات والتجارب الحقلية اللاحقة .

تم تحضير أطباق حاوية على وسط الآكار المائي المعقم بنسبة 20غم آكار لكل لتر ماء مقطر ومن ثم تلقيحها بالعزلات الفطرية المختلفة بشكل منفرد وذلك من مزارع فطرية نقية بعمر سبعة أيام وبثلاثة مكررات لكل منها وبواسطة ثاقب فليني قطرة 5مل يتم وضعها في وسط الطبق ثم حضنت الأطباق في درجة حرارة 25± 2°م وبعد 48 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 عشرة بذور في كل طبق بشكل دائري اذ اصبحت بتماس مع الغزل الفطري ووضعت في الحاضنة على درجة 25± 2 (Christensen واخرون 1988 ) وبعد خمسة أيام حسبت النسبة المئوية للأنبات والبذور المتعفنة والنسبة المئوية للتثبيط باستخدام المعادلات الاتية :

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

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

## 8-3 اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp ضد العزلات الفطرية الممرضة مختبريا

تم اختبار المقدرة التضادية لـ 42 عزلة فطرية تابعة للفطر *Trichoderma* spp المعزولة في هذه الدراسة ، ضد العزلات الفطرية الممرضة والمختارة سابقا *Fusarium sp* ، *Alternaria sp* ، *M.phasolina* وبطريقة الزرع المزدوج ، حيث قسم طبق بتري قطره 9سم حاوي على الوسط الغذائي PDA إلى قسمين متساويين، ولقح القسم الأول من الطبق بلقاح الفطر الممرض حيث اخذ قرص قطره 0.5 سم من مزرعة الفطر بعمر سبعة أيام ، بينما لقح 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±1 مº لمدة أسبوع واحد وقد تم تقدير المقدرة التضادية حسب مقياس Bell وآخرون (1982) والمكون من خمس درجات :

| الدرجة | المواصفات |
|---|---|
| 1 | فطر المقاومة الأحيائية يغطي كامل مساحة الطبق دون السماح للفطر الممرض بالنمو. |
| 2 | فطر المقاومة الأحيائية يغطي ثلثي مساحة الطبق، ويغطي الفطر الممرض الثلث الباقي من الطبق . |
| 3 | فطر المقاومة الأحيائية يغطي نصف مساحة الطبق، و الفطر الممرض تغطي النصف الأخر من الطبق . |
| 4 | فطر المقاومة 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 1 سم عن حافة الطبق وبشكل منفرد ، وحسب معادلة Abbot ( Altindag وآخرون،2006)

### 3-9 التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية للفطر *Trichoderma* ذات القدرة التضادية العالية

شخصت العزلات الفطرية التى اعطت اعلى نتائج تضاد ضد مسببات الامراض النباتية وهي تسع عزلات .والتي تم تشخيصها مظهريا وبشكل مبدئي تعود الى جنس *Trichoderma* حيث استخدم طريقة تحليل قواعد الحامض النووي للمنطقة الجينية SSU ومقارنتها مع العزلات المشخصة مسبقا بعد ارسالها الى شركة Macro gen الكورية الجنوبية لغرض تحديد تتابع النيوكلوتيدات .

بعد اكتمال تحديد تتابع النيوكليدات استخدم برنامج BLAST لتحليل تتابعات النيوكلوتيدية لغرض عمل مقارنة مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية NCBI ضمن Gen Bank والتي تعود للعزلات الفطرية لنفسها والتي تم تشخيصها عالميا .وسجلت العزلات التي لم تطابق اي من التتابعات النيوكلوتيدية 100% في NCBI و باستخدام برنامج MEGA تم تحديد صلة القرابة الوراثية ورسم الشجرة القرابة بين العزلات والعزلات المشابهة لها المسجلة في NCBI .

### 3-10 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* spp المنتخبة ، تم تجهيز وسط البطاطا سكروز السائل Potato Sucrose Broth .P.S.B مختبريا ، وتم نقله الى انابيب اختبار بلاستيكية مغلقة سعة 100مل وعقم الوسط في جهاز التعقيم البخاري المؤصدة . تركت لتبرد ثم تم تلقيح كل منها بثلاثة 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 خمس عشرة يوماً ثم حفظت في الثلاجة لحين الاستخدام .

بعدها رشح الوسط بواسطة ورقة ترشيح ( whatman filter paper No.40) تم اجراء عملية الطرد المركزي ، اذ اخذ الراشح ووضع في أنبوبة اختبار في جهاز الطرد

المركزي على سرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة خمسة دقائق . ثم عقم الرائق باستخدام مرشح دقيق Milipor قياس 22. 0 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* ، *Rhizoctonia sp*، *M.phasolina* ، عملت ثلاثة مكررات لكل معاملة مع الاخذ بنظر الاعتبار وجود معاملة السيطرة التي كانت P.D.A. 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 المعادلات المذكورة انفا

## 3-11 الكشف عن منظم النمو الجبرلين GA3 في رواشح الفطريات

### 3-11-1 تحضير الراشح العزلات الفطرية التسعة الفطر *Trichoderma* spp

حضر الوسط الغذائي السائل P.S.B ووزع الوسط الغذائي السائل على انابيب بلاستيكية معقمه حجم 100 مل بواقع 50 مل لكل انبوبة وفي ظروف تعقيم .بعد ذلك لقح الانابيب بقرص 0.5 ملم من العزلات الفطرية التسعة الفطر *Trichoderma* spp وحفضت في درجة حرارة 25 مئوية لمدة اربعة عشر يوماً في ظروف حضن متحرك بسرعه 90 دوره لدقيقة ورشح الوسط الغذائي السائل بعد ذلك بورق ترشيح Watman 40 و مزج الراشح ليتجانس في محلةٍ وبعد ذلك رشح في Milipor قياس 0.22 مايكرون

### 3-11-2 استخلاص حامض الجبرلين من رواشح العزلات الفطرية التسعة للفطر *Trichoderma* spp

1-اخذ 5مل من الراشح المحضر ويكمل الحجم إلى 10 مل بإضافة ماء مقطر وضبط pH عند 2.5 بأستخدام NHCl

2-اضافه 20 مل من Ethely acetate ورجع القمع جيدا من أجل فصل الطبقات ثم التخلص من الطبقة المائية

3-اعيد استخلاص حامض الجبرلين من Ethely acetate باستخدام بفر فوسفات منظم

4-جمعت الكمية المستخلصة في دورق سعة 50 مل وأكمل الحجم إلى 50مل بفر فوسفات منظم

5-بعدها نقل 20 مل من المحلول المستخلص إلى دورق سعه 100 مل واضاف إليه 10 مل كحول مطلق و 70 مل HCl بتركيز 35%

6-بعد مرور80 دقيقة يتم قياس الامتصاصية باستخدام UV Spectrophotometer عند طول موجي 254 نانوميتر

7- مقارنة النتائج مع المنحى القياسي لمنظم النمو الجبرلين GA3

## 3-11-3 عمل منحى قياسي ومقارنتها مع العزلات المنتجة لجبرلين GA3

تم عمل خمسة تراكيز من المادة القياسية (100,150,200,250,300) لمنظم النمو الجبرلين وتم قياس الامتصاصية بواسطة جهاز UV Spectrophotometer وعلى الطول الموجي 254 نانومتر جدول (6) شكل (3)

**جدول (6) تركيز وامتصاصية المادة القياسية GA3**

| ت | التركيز مايكرو غرام /مل | الامتصاصية/ نانومتر |
|---|---|---|
| 1 | 100 | 0.200 |
| 2 | 150 | 0.420 |
| 3 | 200 | 0.548 |
| 4 | 250 | 0.786 |
| 5 | 300 | 1.200 |

**الشكل (4) يمثل المنحنى القياسي لمنظم النمو الجبرلين GA3**

## 12-3 الكشف عن منظم النمو الاوكسين IAA في رواشح العزلات الفطرية التسعة لفطر *Trichoderma* spp

### 1-12-3 استخلاص والكشف عن منظم النمو IAA

1-أخذ كمية من الراشح المحضر حسب الفقرة (3-11-1) ويوضع في انبوبة وتحرك في السنتر فيوج لغرض مزج وتجانس مكونات الراشح

2- مزج 1 مل من الراشح مع 2 مل من الكاشف Fe-HCIO4 وتركه لمدة 25 دقيقة في درجة حرارة الغرفة .

3- فحصت العينات في جهاز UV Spectrophotometer عند طول موجي 530 نانوميتر

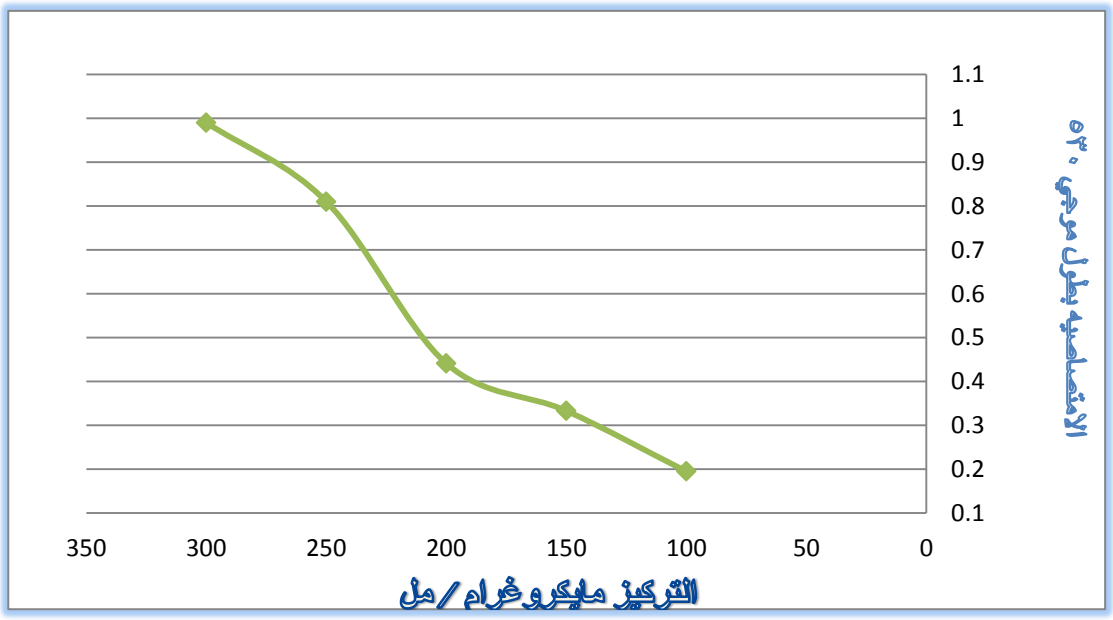
4- مقارنة النتائج مع المنحى القياسي الأوكسين .

## 2-12-3 عمل منحى قياسي لمنظم النمو IAA

حضرت خمسة تراكيز مختلفة من المادة القياسية لمنظم النمو IAA ثم قياس الامتصاصية بواسطة جهاز UV Spectrophotometer عند طول موجي 530 ورسم المنحى القياسي كما في الجدول 7 و الشكل 4 .

**جدول (7) تراكيز وامتصاصية المادة القياسية لمنظم النمو IAA**

| ت | التركيز مايكروغرام/ مل | الامتصاصية / نانومتر |
|---|---|---|
| 1 | 100 | 0.195 |
| 2 | 150 | 0.333 |
| 3 | 200 | 0.441 |
| 4 | 250 | 0.810 |
| 5 | 300 | 0.990 |




**الشكل (5) يمثل المنحنى القياسي ل IAA**

## 13-3 الكشف عن قابلية عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma sp* المنتخبة على انتاج السم الفطري Trichodermin

### 1-13-3 استخلاص السم الفطري Trichodermin من مزارع العزلات الفطرية

حضر الوسط الغذائي السائل Potato Sucrose Broth, PSB وتم توزيعه على انابيب بلاستيكية حجم 100مل بواقع 60 مل لكل انبوبة ثم لقح كل منها بقرص قطره 0.5 ملم من العزلات الفطرية التسعة للفطر *Trichoderma spp* بعد تنميه العزلات الفطرية على وسط PDA وبعمر خمسة ايام . بعد ذلك حضنت في الحاضنة على درجة حرارة 25 ولمده 30 يوما

1-اخذ 25 مل من الراشح من كل عينة واضيف الى 70% من Acetonnitrile

2- تم ترشيح وتجفيف المرشح

3-اعادة اذابة البقايا في المذيب Acetonnitrile والماء وحمض الخليك بنسب 65: 35: 1 على التوالي .

4- تم تعريض الراشح الى موجات فوق الصوتية لمدة 30 دقيقة ثم نقل بعد ذلك الى جهاز الطرد المركزي 4000 دورة على دقيقة

5- تم اخذ الراشح والاحتفاظ به في الثلاجة لحين التحليل

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

تمت عملية التقدير الكمي و النوعي في مختبرات وزارة العلوم ولتكنلوجيا باستخدام جهاز HPLC نموذج (SYKAMN )الماني. الطور المتحرك : Isocoratic acetic acid: acetonitrile: D.W(2:68:30)(V\V) معدل الجريان : عند 1ml/min العمود: -C18 ODS(25cm*4.6mm) مقياس الاشعة فوق البنفسجية (UV-Vis): 254nm

وحساب التركيز من خلال المعادلة

**تركيز النموذج= تركيز المادة القياسية× مساحة النموذج×مساحة المادة القياسية ×(عدد مرات التخفيف \حجم النموذج)**

## 14-3 الخصائص الكيميائية للتربة Soil chemical properties المعزول منها عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* sp المنتخبة

### 1-14-3 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 HANA موديل HI98107 على وفق ما هو موصوف في Page وآخرون (1982).

### 2-14-3 قياس التوصيلية الكهربائية E.C

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

### 3-14-3 قياس الكاربون العضوي والمادة العضوية

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

1- يوضع 0.5 غم من عينة التربة المنخولة ( 0.2 ملم ) في فلاسك ( دورق سعة 500 مل)
2- يضاف 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 1 دقيقة ثم يترك لمدة 1\2 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 ازرق مخضر .

8- يعمل بلانك Blank وذلك باتباع الخطوات الانفة جميعها عدا عمل إضافة نموذج التربة

9- يسحح المحلول لعينة التربة وكذلك Blank مع كبريتات الحديدوز الامونياكية Fe $(NH4)_2$ (H2O)6 ، (SO4)2 ) الوزن الجزيئي لها = 392.14 ويستمر بالتسحيح لحين تحول اللون من الأزرق المخضر الى الأخضر الفاتح .

10- وتقدر قيمة النسبة المئوية للمادة العضوية في التربة وفقا للمعادلة الاتية :

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

OM = النسبة المئوية للمادة العضوية في التربة

T = الحجم المستهلك من كبريتات الحديدوز في عينة التربة

S = الحجم المستهلك من كبريتات الحديدوز في عينة التربة

1.72 = نسبة الكاربون في المادة العضوية = 58%

1.34 = قيمة عيارية داي كرومات البوتاسيوم .

## 15-3 اختبار التوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp المنتجة للسم الفطري *Trichodermin* ومنظمات النمو 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 بطريقة الزرع المزدوج ضد الفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA وبسبب امتلاكها المقدرة على انتاج السم الفطري Trichodermin ومنظمات النمو النباتية .

### 1-15-3 اختبار التضاد الحيوي لعدد من عزلات الفطر *Trichoderma spp* المنتجة للسم الفطري Trichodermin ومنظمات النمو النباتية فيما بينها مختبريا على وسط PDA

تم اجراء هذا الاختبار على خمس عزلات فطرية من اصل تسع عزلات للفطر *Trichoderma spp* تم انتخابها سابقا بعد اثبات قدرتها التضادية باختبار المقدرة التضادية مختبريا ضد الفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA ولها المقدرة على انتاج السم

الفطري Trichodermin بتراكيز مرتفعة نسبيا ولها القدرة على انتاج منظمات النمو النباتية . اذ اجري هذا الاختبار للكشف عن امكانية تكامل اكثر من عزلة فطرية بدون اي مؤشرات تضاد حيوي فيما بينها ، وانتخاب ثلاث عزلات من اصل خمس عزلات بالامكان عمل توليفه منها وتقييم تأثيرها التأزري ضد الفطريات الامراضية .

تم الكشف عن التضاد بين العزلات الفطرية وبطريقة الزرع المزدوج حيث قسم طبق بتري قطره 9 سم حاوي على الوسط الغذائي PDA إلى ثلاثة اقسام متساوية، ولقح كل قسم من الطبق بقرص قطره 0.5 سم من عزلة الفطر *Trichoderma* spp وبعمر سبعة أيام جدول 8 . نفذت التجربة بواقع ثلاثة مكررات. وضعت الأطباق في حاضنة على درجة حرارة25 ±1 م° لمدة أسبوع واحد وقد تم تقدير المقدرة التضادية بوجود مناطق التضاد بين العزلات .

**جدول (8) المعاملات التضادية بين عزلات الفطر *Trichoderma spp* المنتخبة**

| ت | رمز العزلة الفطرية | رمز العزلة الفطرية | رمز العزلة الفطرية |
|---|---|---|---|
| المعاملة 1 | B6 | N2 | D2 |
| المعاملة 2 | B6 | N2 | H3 |
| المعاملة 3 | B6 | N2 | D8 |
| المعاملة 4 | H9 | N2 | D8 |
| المعاملة 5 | H9 | N2 | D2 |

* كل معاملة بواقع ثلاث مكررات .

## 3-15-2 اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma spp* المنتجة للسم الفطري Trichodermin ومنظمات النمو ضد العزلات الفطرية الممرضة حقلياً في الاصص البلاستيكية .

تم اجراء هذا الاختبار على ثلاث عزلات فطرية للفطر *Trichoderma spp* تم انتخابها سابقا بعد اثبات قدرتها التضادية باختبار المقدرة التضادية مختبريا وحقلياً ضد الفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA ولها المقدرة على انتاج السم الفطري Trichodermin بتراكيز مرتفعة نسبيا ولها القدرة على انتاج منظمات النمو النباتية . 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 والتي تم وضعها في اصص بلاستيكية صغيرة سعة 1 كغم وترطيبها، عوملت التربة بالفطر *Trichoderma spp* بشكل مفرد ومشتركة ، المنماة على نخالة الحنطة بوضع 10 غم بشكل كلي ولـثلاثةِ مكررات لكل عينة وتم زرع بذور الباميا المعقمة سطحيا 10 بذرة \ اصص وبعد 3 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 ***Fusarium* sp**
3. معاملة 3 (المقارنة3) اضافة الممرض فقط *M.phasolenia*
4. معاملة 4 اضافة العزلة (T. N2) + ***Fusarium* sp**
5. معاملة 5 اضافة العزلة (T. N2) + *M.phasolenia*
6. معاملة 6 اضافة العزلة (T. H9) + ***Fusarium* sp**
7. معاملة 7 اضافة العزلة (T. H9) + *M.phasolenia*
8. معاملة 8 اضافة العزلة (T.B6) + ***Fusarium* sp**
9. معاملة 9 اضافة العزلة (T.B6) + *M.phasolenia*
10. معاملة 10 اضافة العزلة (T. N2) + (T. B6) + ***Fusarium* sp**
11. معاملة 11 اضافة العزلة (T. N2) + (T. B6) + *M.phasolenia*
12. معاملة 12 اضافة العزلة (T. N2) + (T. H9) + ***Fusarium* sp**
13. معاملة 13 اضافة العزلة (T. N2) + (T. H9) + *M.phasolenia*
14. معاملة 14 اضافة العزلة (T. H9) + (T. B6) + ***Fusarium* sp**
15. معاملة 15 اضافة العزلة (T. H9) + (T. B6) + *M.phasolenia*.
16. معاملة 16 اضافة العزلة (T. H9) + (T. B6) +(T.N2)+ ***Fusarium* sp**
17. معاملة 17 اضافة العزلة (T. H9) + (T. B6) +(T.N2)+ *M.phasolenia* .

- تم قياس النسبة المئوية للانبات وموت البادرات وفق المعادلة التالية:

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

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

## 16-3 : 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 تحويل زاوي ، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار اقل فرق معنوي L.S.D. تحت مستوى معنوية 0.05 .

# 4- النتائج والمناقشة

## 4-1 العزل والتشخيص .

### 4-1-1 عزل وتشخيص الفطريات من عينات التربة

بينت النتائج عزل العديد من الفطريات في عينات التربة التي جمعت من المحافظات العراقية اذ تم الحصول على 42 عزلة تعود للفطر *Trichoderma* spp بالاضافة الى عزلات اخرى مختلفة تعود الى جنس *Aspergillus* spp وجنس *Penicillum* sp *Fusarium* spp وغيرها الجدول9 . وتم حساب النسبة المئوية للظهور والتردد للعزلات الفطرية اذ كانت الاعلى من حيث الظهور والتردد ، العزلات التابعة للفطر *Aspergillus* spp بنسبة ظهور 100% ونسبة تردد18.11 % ، تلتها عزلات الفطر *Penicillium* spp بنسبة 96% و 17.39% لظهور والتردد على التوالي .اما عزلات الفطر *Tricoderma* spp فكانت نسبها 42 % و7.60% .

**جدول(9) العزلات الفطرية المرافقة لعينات التربة المجموعة من محافظات العراق**

| ت | اسم الفطريات المرافقة | النسبة المئوية للظهور% | النسبة المئوية للتردد% |
|---|---|---|---|
| 1 | ***Aspergillus* spp** | **100** | **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** | **42.00** | **7.60** |
| 7 | ***Phoma* spp** | **37.00** | **6.70** |
| 8 | ***M.phaseolina*** | **30.00** | **5.43** |
| 9 | ***Alternaria* spp** | **23.00** | **4.10** |
| 10 | ***Verticillum* spp** | **10.00** | **1.81** |
| 11 | ***Helimanthosporium* spp** | **8.00** | **1.44** |
| 12 | ***Pythium* spp** | **2.00** | **0.36** |

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

لقد اشارت العديد من الدراسات السابقة الى مقدرة العزلات الفطرية لجنس *Trichoderma* spp على النمو في بيئات مختلفة وقدرتها على تحمل الظروف البيئية المختلفة والنمو في جميع انواع الترب كما يعتبر من الفطريات التي تستعمر الجذور في منطقة الرايزوسفير النبات وتعمل على زيادة النمو ومقاومة النبات للمسببات المرضية (Altomare واخرون 1992، Al-Tamimi، 2005). تمتاز بقدرتها على استغلال المواد الغذائية المتنوعة والانتشار السريع ضمن الترب والبيئات المختلفة (Roquebert، 1996)

## 4-1-2 عزل الفطريات الممرضة المرافقة لنباتات الباميا المصابة ..

بينت نتائج الجدول (10) وجود عدد من عزلات الفطر *Fusarium* spp وبنسبة ظهور 40 % وبتردد 28.57% والفطرين *M.phaseolina* و *Rhizoctonia* spp بنسبة ظهور30% و بتردد 21.42% اما الفطر*AIternaria* spp اذ حقق نسبة مئوية لظهور بلغت (20%) و بنسبة تردد 14% وفي المرتبة الاخيرة الفطر *Pythium* spp والفطر *Phytophthora* sp بنسبة ظهور 10 % وبتردد 7.14 % .

**جدول (10) العزلات الفطرية المرافقة جذور وقواعد سيقان نباتات الباميا**

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

لقد اشارت العديد من الدراسات بأن انواع الفطر *Fusarium* spp من الفطريات اختيارية التطفل حيث يستمر في العيش في التربة لعدة سنوات على المواد العضوية ويعتبر من بين الفطريات الاكثر تنوعا والاكثر امراضية ويصيب مدى واسع من العوائل النباتية (Synder وHansen، 1989). اشار حسون (2005) بان الفطر *R. solani* من فطريات التربة الممرضة soil – borne pathogen والمنتشرة في معظم بلدان العالم ويعيش في التربة بشكل رئيسي على

هيئة غزل فطري على المخلفات العضوية او بشكل اجسام حجرية Sclerotia ساكنة . وان الاجسام الحجرية هي الاهم من ناحية احداث الامراض من اللقاح المحمول بالتربة وان الاجسام الحجرية بأمكانها البقاء في حالة غياب العائل لمدة تزيد على 18 شهرآ في الترب الرطبة وبحدود درجة حرارة 30 - 20 م كذلك تبين من دراسات سابقة بان الفطر *M.phaseolina* من اهم المسببات المستوطنة في التربة والمنتقلة بالبذور ، ويسبب مرض التعفن الفحمي والتعفن الجاف لجذور و لفحة الساق والاوراق وسقوط البادرات وتم عزله من عوائل نباتية مختلفة ( Arora واخرون ،2001) وللفطر قابلية على البقاء في التربة لمدة تزيد عن 10 اشهر تحت ظروف الجفاف الشديد على هيئة اجسام حجرية التي تعد الوسيلة الرئيسة لبقاء هذ الفطر (Khan، 2007) . وفي دراسة سابقة تبين ان جنس *Alternaria* spp من الأجناس الفطرية واسعة الانتشار ومن أكبر المسببات المرضية للمحاصيل الزراعية سواء في الحقل أو عند الخزن فهو يصيب عدد كبير من أنواع الحبوب والفواكه والخضروات ( Ellis، 1976) وفي دراسة اخرى تم عزل احد عشر نوعاً يعود لجنس *Alternaria spp* من مصادر مختلفة كالهواء والتربة والفواكه والخضروات وبعض النباتات حيث إن هناك مئة الى عده مئات من الأنواع تعود إلى هذا الجنس (1994,Rotem, عبد الله ،2005).

## 2-4 المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *Fusarium* spp و*Alternaria* spp و *M.phaseolina* مختبرياً .

بينت نتائج اختبار القدرة الامراضية للفطريات الممرضة المعزولة من جذور واوراق نبات الباميا تأثيرات متباينة في قدرتها الامراضية على انبات بذور اللهانة (جدول رقم 11).اذ اظهرت احدى عزلات الفطر *M.phaseolina* تأثيراً معنوياً كبيرا في خفض النسبة المئوية للانبات والتي بلغت 6.6 % وبنسبة تثبيط بلغت 93.5% بينما واظهرت احدى عزلات الفطر *Fusarium* spp تأثيراً معنوياً في خفض نسبة الانبات التي بلغت 30% وبنسبة تثبيط 67.7% سببت احدى عزلات الفطر *AIternaria* spp خفض معنوي لنسبة الانبات اذ بلغت 26.6% ونسبة تثبيط 72% مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت نسبة تثبيط 0.00% . وثم اختيرت اكثر العزلات ضراوة من كل نوع فطري ، لاستخدامها في التجارب اللاحقة .

**جدول (11) اختبار القدرة الامراضية للفطريات المعزولة في هذه الدراسة في انبات بذور اللهانة في اطباق بتري**

| ت | العزلات | لنسبة المئوية للإنبات |
|---|---|---|
| 1 | ControI | 93.3 |
| 2 | *Fusarium* sp (1) | 30.0 |
| 3 | *Fusarium* sp (2) | 53.33 |
| 4 | *Fusarium* sp (3) | 53.33 |
| 5 | *Fusarium* sp (4) | 60.00 |
| 6 | *M.phaseolina* (1) | 56.66 |
| 7 | *M.phaseolina* (2) | 6.60 |
| 8 | *M.phaseolina* (3) | 53.33 |
| 9 | *AIternaria* sp (1) | 53.33 |
| 10 | *AIternaria* sp (2) | 26.6 |
| 11 | *AIternaria* sp (3) | 60.00 |
| | *L.S.D 0.05* | 2.307 |

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

اذ يعود سبب فشل الانبات الى قدرة هذه الفطريات الى افراز الانزيمات المحللة للسليلوز والكايتين، والبروتين والتي تسبب تعفن البذور او افراز المواد الايضية ذات التاثير السام واختلافها في مقدرتها على إفراز الانزيمات المحلله للبكتين لاسيما الأنزيم polygalacturonase إذ إن العزلات غير الممرضة تكون ذات فعالية واطئة في إنتاج هذا الانزيم او إفراز الانزيمات المحللة للكنين الموجود في جدار خلية العائل مثل Ligninase، Peroxidase وما لذلك من أهمية في أحداث الاصابة وانتشار سموم،الفطر وأنزيماته في تلك الخلايا مما يؤدي الى فشل الانبات.( Aboud وآخرون، 2001 وInoue واخرون، 2002 وLozovaya واخرون، 2006).

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

### 1-3-4 اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp ضد الفطر *Fusarium* spp

اظهرت النتائج الجدول (12) أنَّ لعزلات الفطرية للفطر *Trichoderma spp* تأثيراً معنوياً متبايناً في تثبيط عزلة الفطر *Fusarium* sp المختارة حيث تراوحت بين 87.70- 44.44% حيث كان للعزلات الفطر *Trichoderma* spp T.D2, T.S3,T.S10,T.D8,T.H9

TB6 ,T.S2،TH3,TN2 تأثير معنوي عالي تفوقت على معظم العزلات المختبرة في تثبيط الفطر التي كانت نسبتها بين 86.6-81.48% وأنَّ اقل تثبيط اظهرتُ العزلة T.M2 والذي بلغ 44.44% .

**جدول(12)النسبة المئوية لتثبيط عزلات الفطر *Trichoderma spp* ضدالفطر*Fusarium sp***

| ت | العزلة الفطرية *Trichoderma* spp | النسبة % للتثبيط | ت | العزلة الفطرية *Trichoderma* spp | النسبة % للتثبيط | ت | العزلة الفطرية *Trichoderma* spp | النسبة % للتثبيط |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | T.K3 | 77.70 | 15 | T.H5 | 62.96 | 29 | T.A6 | 66.66 |
| 2 | T.K4 | 70.30 | 16 | T.H6 | 77.77 | 30 | T.M1 | 81.48 |
| 3 | T.K10 | 62.90 | 17 | T.H7 | 66.66 | 31 | T.M2 | 44.44 |
| 4 | T.K8 | 85.00 | 18 | T.H8 | 77.77 | 32 | T.D4 | 62.96 |
| 5 | T.D2 | 86.60 | 19 | T.H9 | 81.48 | 33 | T.C1 | 55.55 |
| 6 | T.D3 | 77.77 | 20 | T.B1 | 77.77 | 34 | T.K5 | 66.76 |
| 7 | T.D8 | 84.00 | 21 | T.B4 | 70.38 | 35 | T.H2 | 66.66 |
| 8 | T.D7 | 74.00 | 22 | T.B6 | 85.70 | 36 | T.H3 | 87.70 |
| 9 | T.D9 | 74.00 | 23 | T.B10 | 55.55 | 37 | T.H4 | 74.00 |
| 10 | T.D10 | 81.40 | 24 | T.S2 | 83.30 | 38 | T.S10 | 83.33 |
| 11 | T.N2 | 85.00 | 25 | T.S3 | 85.74 | 39 | T.A3 | 74.00 |
| 12 | T.N4 | 81.4 | 26 | T.S5 | 70.00 | 40 | T.A5 | 77.77 |
| 13 | T.N9 | 62.90 | 27 | T.S6 | 55.55 | 41 | T.S8 | 62.00 |
| 14 | T.N10 | 59.00 | 28 | T.S7 | 59.00 | 42 | T.N5 | 77.76 |
| 43 | **الفطر الممرض فقط** | 0 | | | | | | |
| | L.S.D 0.05 | 1.149 | | | | | | |

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

***Trichoderma spp*** | ***Fusarium* sp + *Trichoderma spp*** | ***Fusarium spp***

**الشكل (6) نموذج من المقدرة التضادية للعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد الفطر الممرض *Fusarium* spp**

لقد بينت نتائج الدراسات السابقة أنَّ العامل الاحيائي *T.harzianum* كان فعالاً وبشكل معنوي في تثبيط نمو الفطر *F.oxysporum* و *F.chlamydosporum* المسبب لمرض موت البادرات على الحنطة (Ahmed واخرون ، 2013) وفي دراسة اخرى لتقييم فعالية الفطر الاحيائي *T.harzianum* ضد خمس سلالات من انواع الفطر *Fusarium* spp والذي اثبت فعالية عالية في تثبيط الفطر وتقليل افراز السموم الفطريات الممرضة (Blaszczyk واخرون ،2017) كذلك استخدمت اربع عزلات مختلفة للفطر *T.reesei* في المكافحة الحيوية ضد الفطر *F. oxysporum* بسبب امتلاكة قدرة على انتاج المستقلبات الثانوية التي تكون قادرة على تحطيم الجدار الخلوي للمسببات المرضية ( Kubicek واخرون ،2011 ، Seiboth واخرون ،2012) وفي دراسة اخرى اظهر الفطر *T.reesei* قدرة تثبيطية بنسبة 65 % في نمو الفطر *F. oxysporum* واختبر تأثيرةُ التأزري مع المبيد الفطري اذ عززت في نسبة التثبيط لتصل الى زيادة بنسبة 36% .(Maria واخرون ،2020) .

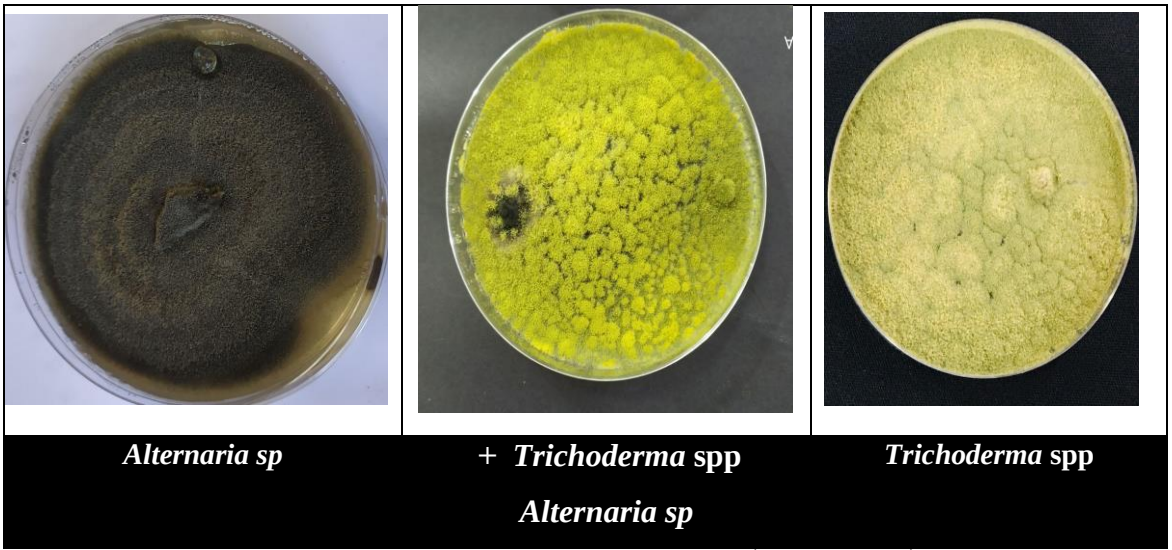
## 2-3-4 المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد الفطـــــــــــر *Alternaria spp*

اظهرت النتائج الجدول (13) المقدرة التثبيطية بين تأثير عزلات الفطر *Trichoderma* spp التي تراوحت بين 62.96-88.8 % حيث تفوقت العزلات بشكل معنوي على جميع العزلات الاخرى *T.S2, T.N2, T.H3, T.H9, T.D8, T.S10, T.S3, T.D2, T.B6* في تثبيط الفطر *Alternaria* spp والتي تراوحت بين 81-88.8 % وأنَّ عزلة T.H7 كانت الاقل تأثير حيث بلغت نسبة التثبيط 62.96% .

**جدول(13) النسبة المئوية للتثبيط لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد عزلة الفطر الممرض *Alternaria sp***

| ت | العزلة الفطرية *Trichoderma spp* | النسبة % للتثبيط | ت | العزلة الفطرية *Trichoderma spp* | النسبة % للتثبيط | ت | العزلة الفطرية *Trichoderma spp* | النسبة % للتثبيط |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | T.K3 | 70.00 | 15 | T.H5 | 81.00 | 29 | T.A6 | 70.00 |
| 2 | T.K4 | 70.00 | 16 | T.H6 | 70.00 | 30 | T.M1 | 77.77 |
| 3 | T.K10 | 77.77 | 17 | T.H7 | 62.96 | 31 | T.M2 | 70.00 |
| 4 | T.K8 | 81.00 | 18 | T.H8 | 74.07 | 32 | T.D4 | 66.66 |
| 5 | T.D2 | 88.8 | 19 | T.H9 | 85.78 | 33 | T.C1 | 74.07 |
| 6 | T.D3 | 74.07 | 20 | T.B1 | 85.78 | 34 | T.R2 | 70.77 |
| 7 | T.D7 | 77.77 | 21 | T.B4 | 70.00 | 35 | T.H2 | 74.00 |
| 8 | T.D8 | 88.88 | 22 | T.B6 | 87.74 | 36 | T.H3 | 81.48 |
| 9 | T.D9 | 77.70 | 23 | T.B10 | 74.07 | 37 | .T.H4 | 74.00 |
| 10 | T.D10 | 66.60 | 24 | T.S2 | 85.78 | 38 | .T.S8 | 62.96 |
| 11 | T.N2 | 81.48 | 25 | T.S3 | 85.78 | 39 | T.S10 | 88.88 |
| 12 | T.N4 | 77.77 | 26 | T.S5 | 70.77 | 40 | .T.A3 | 79.60 |
| 13 | T.S6 | 66.66 | 27 | T.N9 | 74.07 | 41 | .T.A5 | 70.07 |
| 14 | T.N10 | 74.00 | 28 | T.S7 | 66.66 | 42 | .T.N5 | 74.00 |
| 43 | الفطر الممرض فقط | %0.00 | | | | | | |
| L.S.D 0.05 | | 1.186 | | | | | | |

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




**الشكل (7) القدرة التضادية للعزلات الفطرية للفطر *Trichoderma* spp ضد الفطر الممرض *Alternaria sp***

للفطر *Trichoderma* spp القابلية على انتاج بعض المضادات الحيوية و التي لها تأثيراً مباشرٌ في قتل او تثبيط الكائن المنافس من الاحياء الدقيقة الأخرى ( Dias و أخرون ، 2012 )

ومن بين تلك المضادات الحيوية Peptaibols و Polyketides و Steroids و Trichorzianines و Alamethicine و Trichodermin و Suzukacillin التي تعمل على تثبيط نمو الخيط الفطري للمسبب المرضي المنافس ومنعه من أنتاج الابواغ ( Mukerj وGarg Harman و 1987 ، ،2000 و شمران ، 2017 ) كذلك ادى استخدام *T.asperelloides* إلى مقاومه العديد من المسببات المرضية , *A.alternata, B.cinera ,Phytophthora spp* *P.ultima ,R. solani ,S.rolfsii* (Samuels و اخرون ، 2010 و Gal- emed واخرون ، 2011 وDoley واخرون ،2012 و Ramírez-Criño واخرون ،2019 ) كما استخدم الفطر *T.harzianum* في تثبيط الفطر *Alternaria alternata* حيث اظهر مقدرة تضادية عالية حيث كانت درجة التضاد 1.3 تحت الظروف المختبرية (احمد واخرون ،2019)

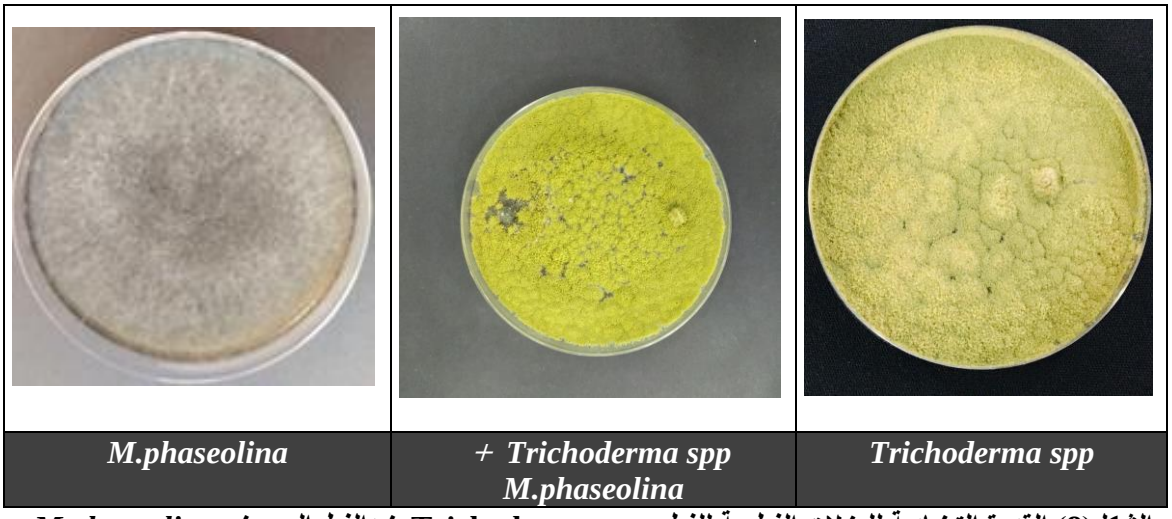
**3-3-4 : المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد الفطر *M.phaseolin***

اظهرت النتائج في الجدول (14) قدرة تثبيطة معنوية متباينة بين تأثير عزلات الفطر *Trichoderma spp* تراوحت بين 44.44-90.07%. اذ تفوقت العزلات T.D2 ,T.S3 TN2, TH3, T.H9, T.D8, T.S10، T.S2, TB6 بشكل معنوي على جميع العزلات الاخرى .في تثبيط الفطر *M.phaseolina* والتي حققت نسبة تثبيط بلغت 90.07- 81.48 %. وحققت العزلة T.H2 اقل نسبة تثبيط بلغت 44.44%. وهذه النتيجة تتوافق مع نتائج دراسة سابقة التي وجد فيها أن 14 عزلةً من الفطر *Trichoderma* spp. كانت ذات قدرة تضادية عالية تراوحت ما بين 1.1-1.8 اعتمادا على سلم التضاد Bell (حافظ ، 2005) . كما وجد أن الفطر *T. harzianum* قد ثبط نمو الفطر *M. phaseolina* على الوسط مستخلص البطاطا دكستروز(طه، 1987) . ووجد ان عزلتين من الفطر *Trichoderma* spp اظهرت قدرة تثبيط عالية على نمو وتكوين الاجسام الحجرية للفطر *M. phaseolina* المعزول من نبات السمسم (Mihail، 1989 )

**جدول(14) النسبة المئوية للتثبيط لعزلات الفطر *Trichoderma* spp ضد الفطر الممرض *M.phaseolina***

| ت | العزلة الفطرية *Trichoderma* spp | النسبة % للتثبيط | ت | العزلة الفطرية *Trichoderma* spp | النسبة % للتثبيط | ت | العزلة الفطرية *Trichoderma* spp | النسبة % للتثبيط |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | T.K3 | 70.37 | 15 | T.H5 | 53.70 | 29 | T.A6 | 70.07 |
| 2 | T.K4 | 77.77 | 16 | T.H6 | 81.48 | 30 | T.M1 | 66.66 |
| 3 | T.K10 | 70.37 | 17 | T.H7 | 77.77 | 31 | T.M2 | 66.66 |
| 4 | T.K8 | 81.48 | 18 | T.H8 | 74.07 | 32 | T.D4 | 74.07 |
| 5 | T.D2 | 90.07 | 19 | T.H9 | 81.48 | 33 | T.C1 | 59.26 |
| 6 | T.D3 | 74.07 | 20 | T.B1 | 77.77 | 34 | T.R2 | 67.60 |
| 7 | T.D7 | 70.37 | 21 | T.B4 | 66.66 | 35 | T.H2 | 44.44 |
| 8 | T.D8 | 85.18 | 22 | T.B6 | 90.07 | 36 | T.H3 | 85.14 |
| 9 | T.D9 | 70.37 | 23 | T.B10 | 59.27 | 37 | T.H4 | 66.66 |
| 10 | T.D10 | 81.48 | 24 | T.S2 | 81.48 | 38 | T.S8 | 62.96 |
| 11 | T.N2 | 90.07 | 25 | T.S3 | 85.7 | 39 | T.S10 | 81.84 |
| 12 | T.N4 | 66.66 | 26 | T.S5 | 62.96 | 40 | T.A3 | 66.66 |
| 13 | T.S6 | 51.85 | 27 | T.N9 | 81.48 | 41 | T.A5 | 62.96 |
| 14 | T.N10 | 74.00 | 28 | T.S7 | 70.37 | 42 | T.N5 | 74.00 |
| 43 | الفطر الممرض فقط | | الفطر الممرض فقط | | | | | |
| | L.S.D 0.05 | | 1.205 | | | | | |

* كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاثة مكررات



*Trichoderma spp* | *+ Trichoderma spp M.phaseolina* | *M.phaseolina*

**الشكل(8) القدرة التضادية للعزلات الفطرية للفطر Trichoderma spp ضدالفطرالممرض *M.phaseolina***

## 4- 4 تاثير راشح عزلات الفطر*Trichoderma spp* في النمو القطري للفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA مختبرياً

اظهر اختبار الرواشح الفطرية لتسعِ عزلات *Trichoderma* spp المنتخبة ، مقدره تثبيطية متباينة معنويا بينها وتراوحت بين 41.6-88.8% وكان اعلى تأثير 88.8% على الفطر *M.phaseolina* في راشح العزلة T.N2 واقل نسبة تثبيط على الفطر*Alternaria* spp بنسبة تثبيط 41.6 % في راشح العزلة الفطرية T.S3وبشكل عام يعزى هذا التأثير الى احتواء الراشح على الكثير من مركبات الايض الثانوي التي تعمل على تثبيط نمو الفطريات الممرض للنبات والتي قيد يكون من السم الفطري Trichodermin مما له من تأثيرات مباشرة في تثبيط نمو الفطريات الاخرى. اما تأثير الراشح على الفطر*Alternaria* sp فأختلفت معنويا بينها اذ تراوح بين 78-41.6 %فكانت اعلى نسبة تثبيط 78.00 % للعزلة T.S10 واقل نسبة تثبيط للعزلة T.S3 41.6 % . بينما كانت النتائج على الفطر *Fusarium* sp بين 81.5 -56.2 % فحققت رواشح العزلة T.N2 اعلى نسبة تثبيط بلغت 81.5% واقل نسبة تثبيط كانت 56.2 في العزلة T.S2.اما معدل التأثير فتراوحت بين 60.6- 78.96 % اذ كانت رواشح العزلة T.N2 الاعلى تأثير على نمو المسببات المرضية وكانت العزلة T.S3 الاقل تأثير على نمو المسببات المرضية .

**جدول (15) تأثير راشح عزلات الفطر *Trichoderma sp* في النسبة المئوية للتثبيط في النمو القطري لعزلات الفطريات الممرضة**

| ت | المعاملات | النسبة المئوية لتثبيط M.phaseolina | النسبة المئوية لتثبيط Alternaria sp | النسبة المئوية لتثبيط Fusarium sp | معدل نسبة التثبيط |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | الممرض بدون أي اضافة | %0.00 | %0.00 | %0.00 | %0.00 |
| 2 | الممرض + راشح .T.B6 | 83.30 | 58.30 | 62.50 | 68.00 |
| 3 | الممرض + راشح T.N2 | 88.80 | 66.60 | 81.50 | 78.96 |
| 4 | الممرض + راشح T.D2 | 83.03 | 71.60 | 65.00 | 73.30 |
| 5 | الممرض + راشح T.H9 | 77.70 | 75.00 | 80.00 | 77.56 |
| 6 | الممرض + راشح T. H3 | 77.70 | 75.00 | 65.00 | 72.56 |
| 7 | الممرض+ راشح T.S2 | 70.00 | 66.60 | 56.20 | 64.26 |
| 8 | الممرض + راشح T.S3 | 77.70 | 41.60 | 62.50 | 60.60 |
| 9 | الممرض + راشح T.S10 | 83.30 | 78.00 | 75.00 | 78.70 |
| 10 | الممرض + راشح T.D8 | 71.10 | 66.60 | 62.50 | 66.73 |
| | L.S.D (0.05) | 1.183 | 0.997 | 1.308 | ----- |

تم الكشف دراسات سابقه عن مركب Trichodermin في العديد من انواع الفطر *Trichoderma spp* (Corley واخرون ، 1994و Cardoza واخرون ،2011) اذ يعتبر واحداً من عائلة مركبات sesquiterpenoid المستقلبات التي تمتلك مجموعه (Olefinci) في الموقع C10-C9 ومجموعة (epoxide) بين C12-C13 على هيكل trichothecene الذي يعرف ويوصف ب 12-13epoxide والتي تمتلك القدرة في تثبيط الكثير من الفطريات المسببة لامراض النبات ( Godtfredsen واخرون ، 1965) كما يمتلك القدرة على الا نتشار بسرعة عبر جدار الخلية ويرتبط بالرايبوسوم حقيقية النواة لمنع ترجمة البروتينات عن طريق التفاعل مع ناقل البيبتيديل (Westerbergواخرون،1976) وفي دراسة سابقة اظهر المركب Trichodermin قدرة تضادية للميكروبات ضد الفطريات الخيطية والخمائر والبكتريا والكثير من انواع الفطريات (Tijerino واخرون ،2011)

## 5-4:التقدير الكمي والنوعي لمنظمات النمو $GA_3$ و IAA في عزلات الفطر *Trichoderma* sp

أظهرت نتائج الكشف عن منظم النمو حامض الجبرلين مقدره جميع العزلات التسعة للفطر الاحيائي *Trichoderma*على إنتاج منظم النمو في الوسط الغذائي السائل، بعد مقارنة النتائج مع المنحى القياسي لحامض الجبرلين تبين أن هناك تبايناً في قدرة هذه العزلات على إنتاج منظم النمو حيث أظهرت العزلة T.N2 أعلى تركيز للحامض حيث بلغت 290 مايكرو غرام /مل في حين كانت العزلة T.H9 هي الأقل انتاجاً بتركيز بلغ 30 مايكرو غرام/مل الجدول 16 . وأظهرت نتائج الكشف عن منظم النمو الاوكسين IAA قدره جميع العزلات على إنتاج منظم النمو في الوسط الغذائي السائل. وقد تبين أن هناك تبايناً في قدرة هذه العزلات على إنتاج منظم النمو حيث تفوقت العزلة T.S10 بشكل معنوي على جميع العزلات بأنتاجها 260 مايكرو غرام /مل في حين كانت العزلة T.H3 هي الأقل انتاجاً بتركيز بلغ 90 مايكرو غرام/مل

**جدول (16) التقدير الكمي والنوعي لمنظمات النمو $GA_3$ و IAA لعزلات الفطر *Trichoderma* spp**

| ت | العزلات الفطرية | التقدير الكمي $GA_3$ مايكرو غرام / مل | التقدير الكمي IAA ميكروغرام / مل |
|---|---|---|---|
| 1 | T.S2 | 193 | 160 |
| 2 | T.S3 | 125 | 220 |
| 3 | T.S10 | 124 | 260 |
| 4 | T.H3 | 85 | 90 |
| 5 | T.H9 | 30 | 245 |
| 6 | T.B6 | 122.5 | 140 |
| 7 | T.N2 | 290 | 115 |
| 8 | T.D2 | 40 | 145 |
| 9 | T.D8 | 70 | 95 |
| | L.S.D. ….(0.05) | 1.998 | 2.913 |

*كل رقم في الجدول يمثل ثلاث مكررات

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

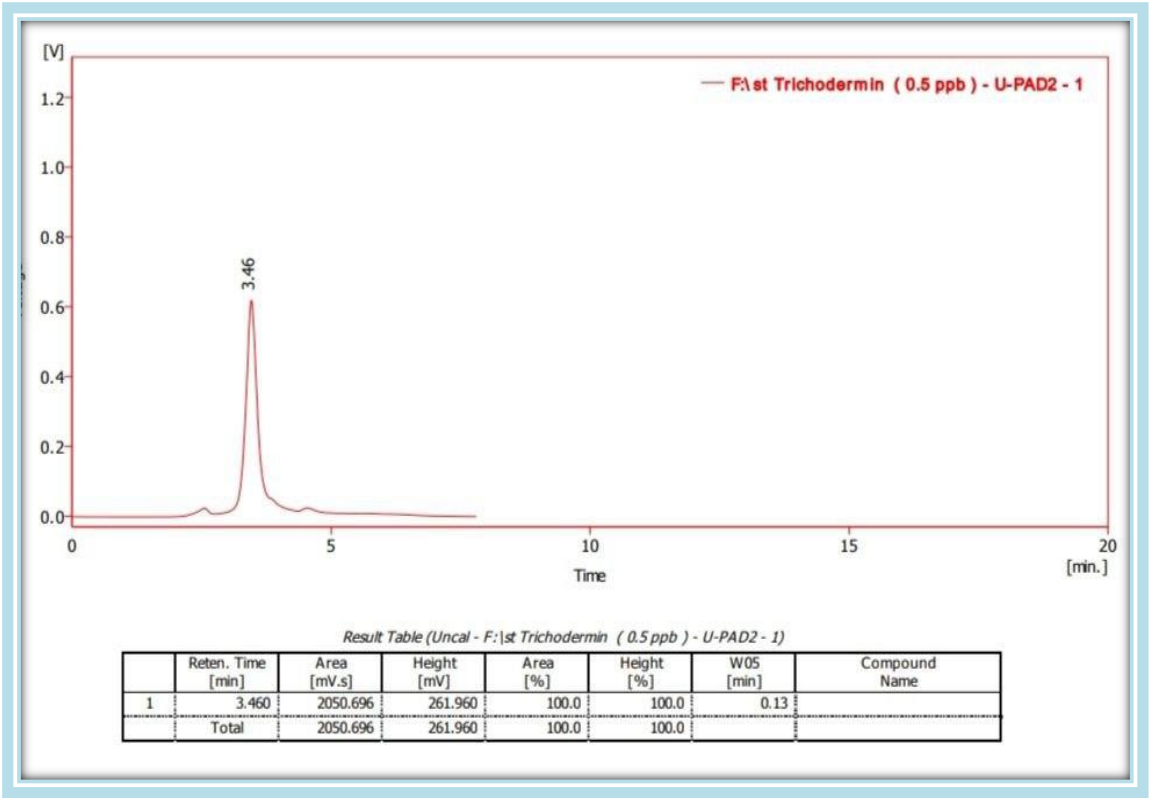
اوضحت نتائج الكشف عن السم الفطري Trichodermin اختلافاً معنوياً بين مقدرة العزلات الفطرية على انتاج السم الفطري حيث بين الكشف عن التراكيز المختلفة والتي تراوحت (331.1-60 ) وتفوقت العزلة T.H9 بشكل معنوي على جميع العزلات الاخرى . وتتفق هذه النتيجة مع نتائج الدراسات السابقة حول قدرة العزلات الفطرية *Trichoderma* spp على انتاج السم الفطري Trichodermin اذ تم عزلة اول مرة من الفطر *T.viride* من خلال راشح الفطر وتم تصويرة بواسطة X-ray و الرنين المغناطيس النووي (Godtfredsen وVangedal,1964 ) ايضاً تم الكشف عن السم الفطري من خلال تحليل HPLC من الفطر *T.reesei* (Watts واخرون ،1988) .

**جدول(17) التقدير الكمي والنوعي لسم Trichodermin لعزلات الفطر *Trichoderma sp***

| ت | العزلات الفطرية | التقدير الكمي<br>ميكروغرام / غم |
|---|---|---|
| 1 | العزلةT.B6 | 168.1 |
| 2 | العزلة T.D2 | 74.6 |
| 3 | العزلة T.D8 | 127.1 |
| 4 | العزلةT.H 3 | 136.6 |
| 5 | العزلة T.H 9 | 331.7 |
| 6 | العزلة T.N 2 | 115.3 |
| 7 | العزلة T.S2 | 79.6 |
| 8 | العزلة T.S 3 | 66.3 |
| 9 | العزلة T.S 10 | 60.0 |
| | L.S.D (0.05) | 1.606 |

*كل رقم في الجدول يمثل ثلاث مكررات

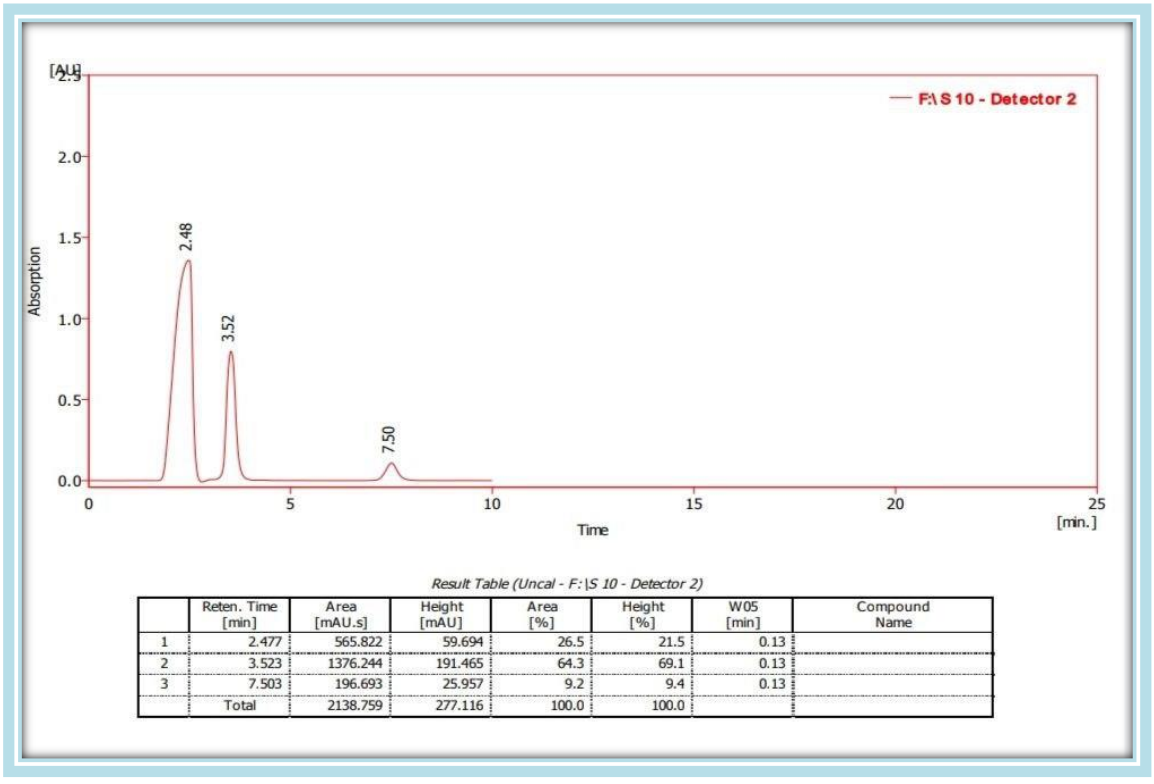
ايضاً تم الحصول علية من الفطريات *T.viride ,T.harzianum ,T.longibraachiatum* *,T.reese* (Godtfredsen وVangedal Watts, 1964 واخرون 1988 ، Nielsen واخرون 1998 ،2005،Reino واخرون 2008، Yang واخرون 2010 ،Tijerino واخرون 2011) .وعزل Trichodermin من الفطر *T.brevicompactum* ومن اوساط زرعية سائلة و صلبة بواسطة تقنية LC-MS ( Degenkolb واخرون ،2008)




Result Table (Uncal - F:\st Trichodermin ( 0.5 ppb ) - U-PAD2 - 1)

| | Reten. Time [min] | Area [mV.s] | Height [mV] | Area [%] | Height [%] | W05 [min] | Compound Name |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 3.460 | 2050.696 | 261.960 | 100.0 | 100.0 | 0.13 | |
| | Total | 2050.696 | 261.960 | 100.0 | 100.0 | | |

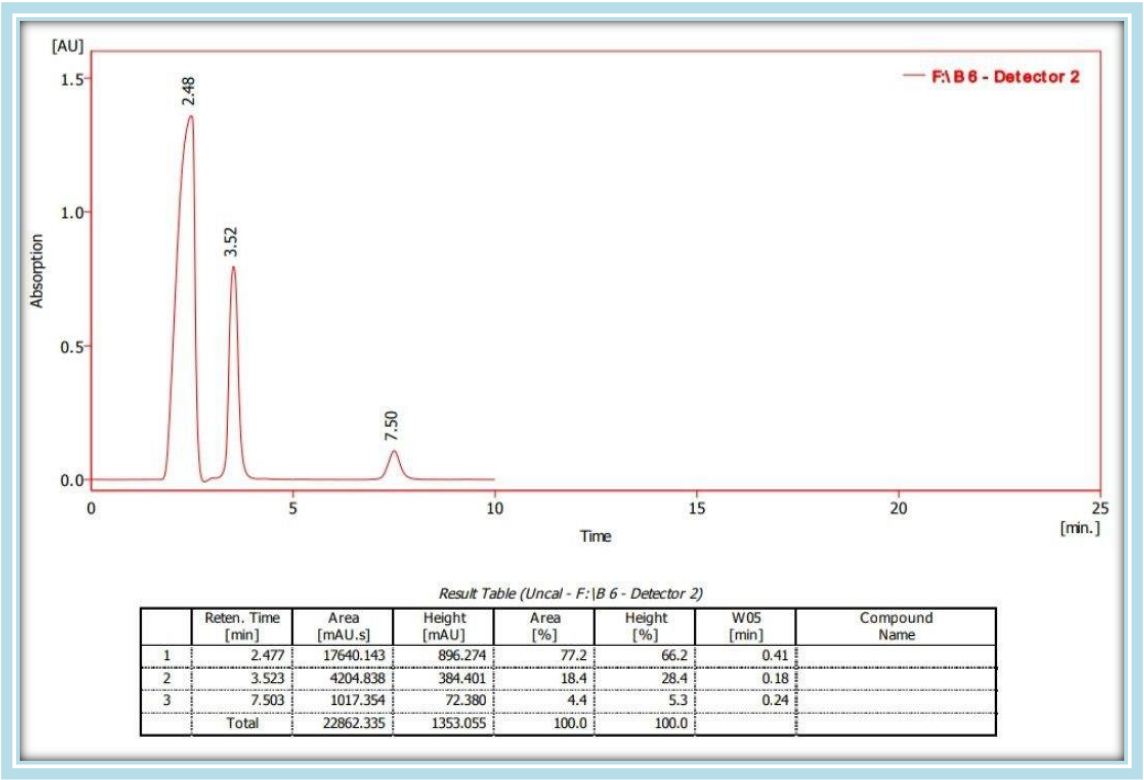
**الشكل (9) التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري الماده القياسية Trichodermin**




Result Table (Uncal - F:\S 10 - Detector 2)

| | Reten. Time [min] | Area [mAU.s] | Height [mAU] | Area [%] | Height [%] | W05 [min] | Compound Name |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.477 | 565.822 | 59.694 | 26.5 | 21.5 | 0.13 | |
| 2 | 3.523 | 1376.244 | 191.465 | 64.3 | 69.1 | 0.13 | |
| 3 | 7.503 | 196.693 | 25.957 | 9.2 | 9.4 | 0.13 | |
| | Total | 2138.759 | 277.116 | 100.0 | 100.0 | | |

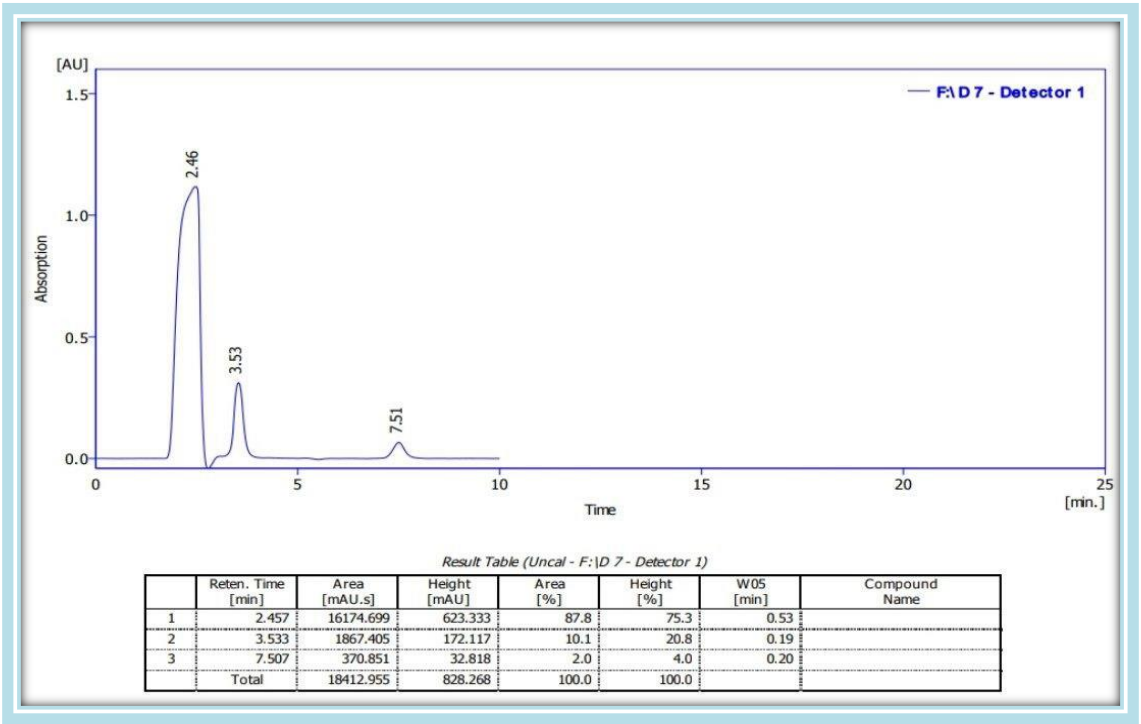
**الشكل (10) التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.S10**




*Result Table (Uncal - F:\B 6 - Detector 2)*

| | Reten. Time [min] | Area [mAU.s] | Height [mAU] | Area [%] | Height [%] | W05 [min] | Compound Name |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.477 | 17640.143 | 896.274 | 77.2 | 66.2 | 0.41 | |
| 2 | 3.523 | 4204.838 | 384.401 | 18.4 | 28.4 | 0.18 | |
| 3 | 7.503 | 1017.354 | 72.380 | 4.4 | 5.3 | 0.24 | |
| | Total | 22862.335 | 1353.055 | 100.0 | 100.0 | | |

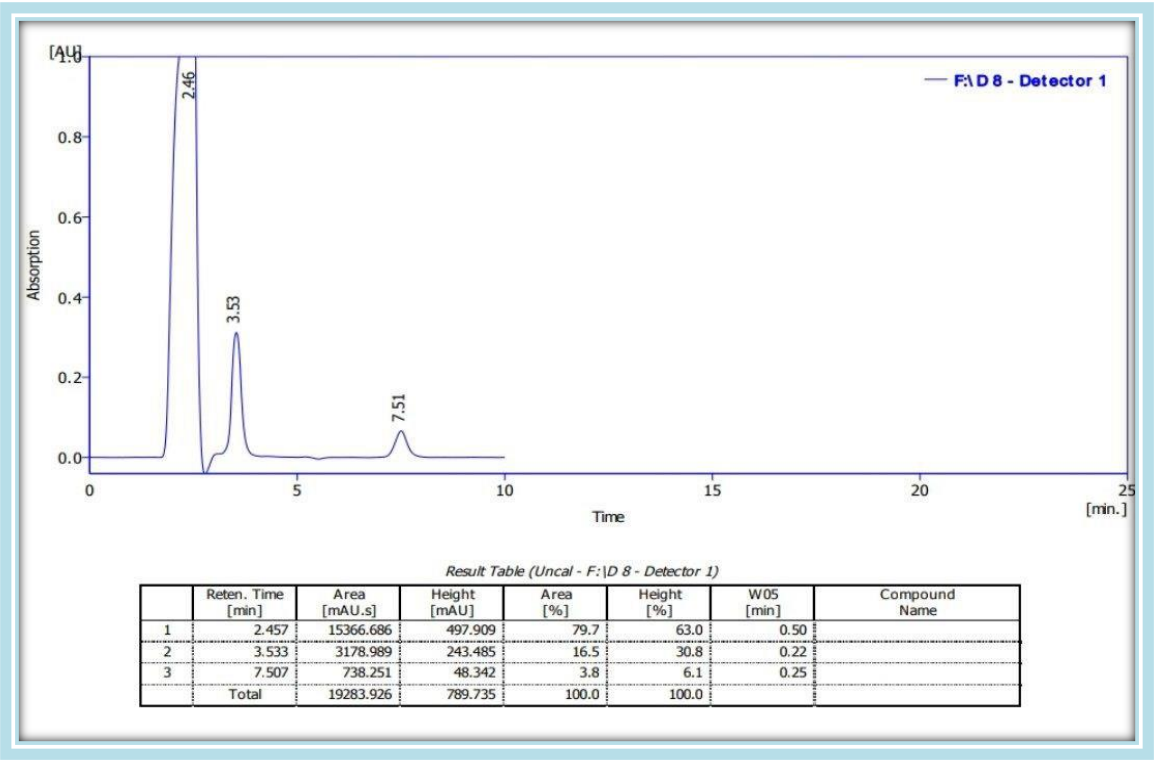
**الشكل (11) التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.B6**




*Result Table (Uncal - F:\D 7 - Detector 1)*

| | Reten. Time [min] | Area [mAU.s] | Height [mAU] | Area [%] | Height [%] | W05 [min] | Compound Name |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.457 | 16174.699 | 623.333 | 87.8 | 75.3 | 0.53 | |
| 2 | 3.533 | 1867.405 | 172.117 | 10.1 | 20.8 | 0.19 | |
| 3 | 7.507 | 370.851 | 32.818 | 2.0 | 4.0 | 0.20 | |
| | Total | 18412.955 | 828.268 | 100.0 | 100.0 | | |

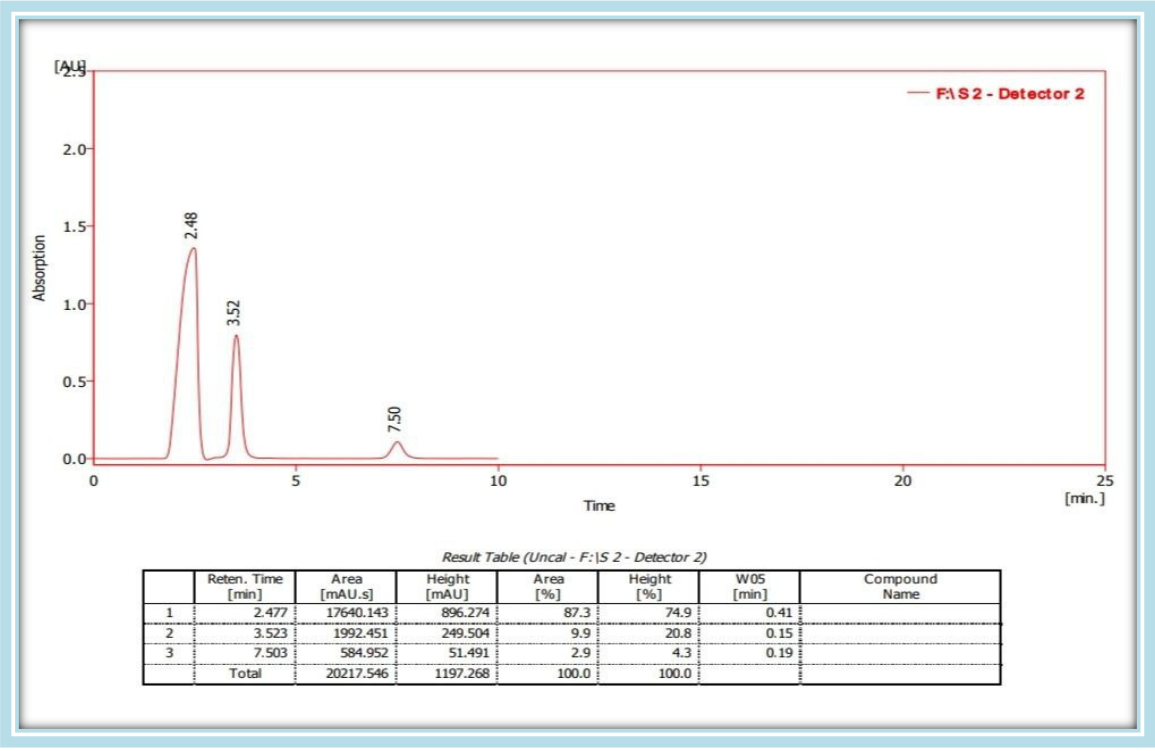
**الشكل (12) التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.D2**




*Result Table (Uncal - F:\D 8 - Detector 1)*

| | Reten. Time [min] | Area [mAU.s] | Height [mAU] | Area [%] | Height [%] | W05 [min] | Compound Name |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.457 | 15366.686 | 497.909 | 79.7 | 63.0 | 0.50 | |
| 2 | 3.533 | 3178.989 | 243.485 | 16.5 | 30.8 | 0.22 | |
| 3 | 7.507 | 738.251 | 48.342 | 3.8 | 6.1 | 0.25 | |
| | Total | 19283.926 | 789.735 | 100.0 | 100.0 | | |

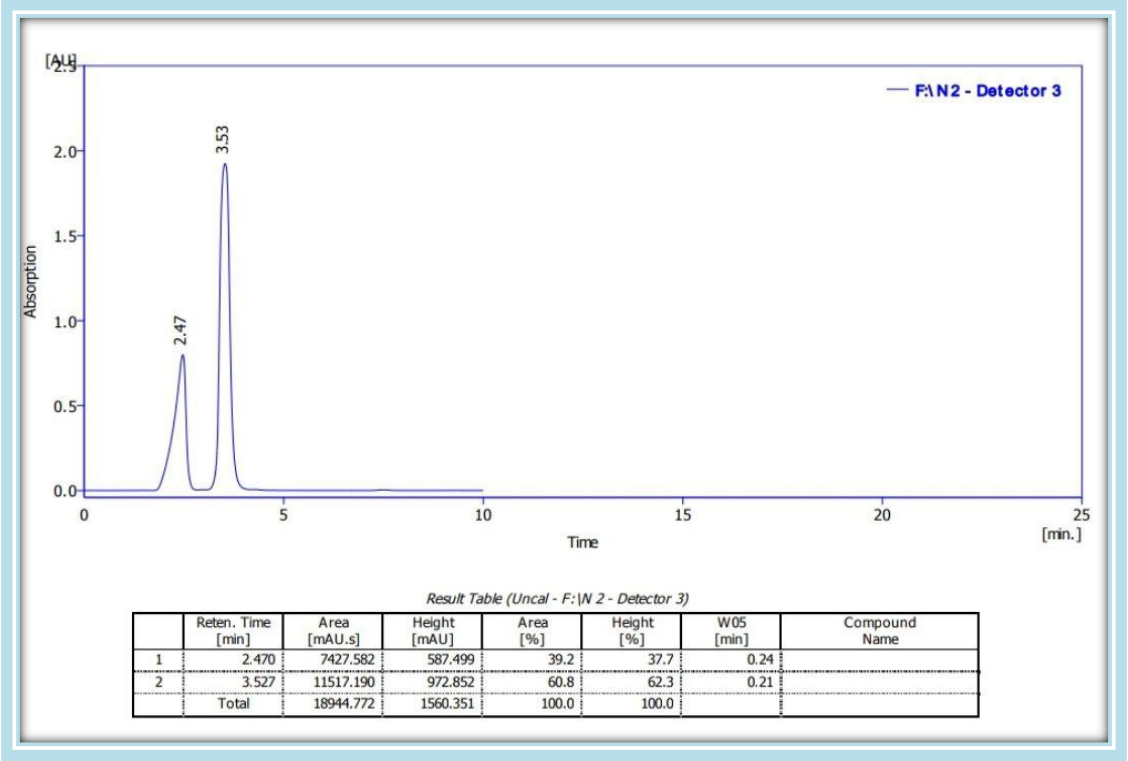
**الشكل (13) التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.D8**




*Result Table (Uncal - F:\S 2 - Detector 2)*

| | Reten. Time [min] | Area [mAU.s] | Height [mAU] | Area [%] | Height [%] | W05 [min] | Compound Name |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.477 | 17640.143 | 896.274 | 87.3 | 74.9 | 0.41 | |
| 2 | 3.523 | 1992.451 | 249.504 | 9.9 | 20.8 | 0.15 | |
| 3 | 7.503 | 584.952 | 51.491 | 2.9 | 4.3 | 0.19 | |
| | Total | 20217.546 | 1197.268 | 100.0 | 100.0 | | |

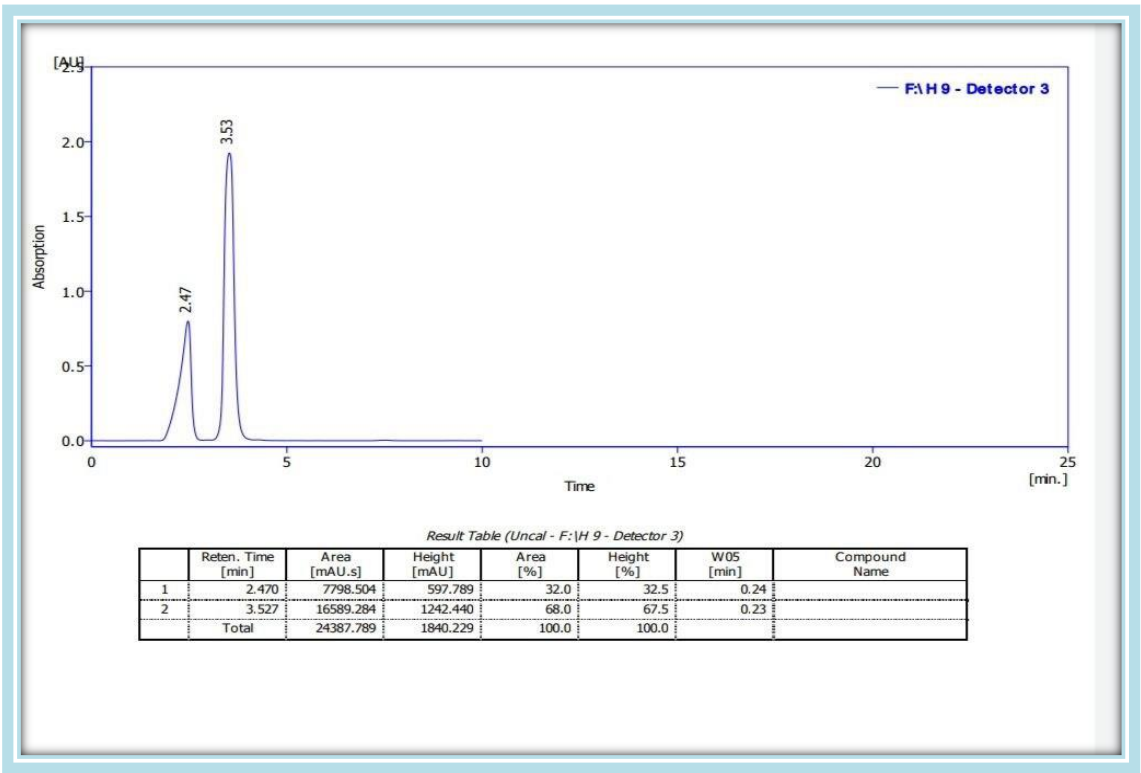
**الشكل (14) التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.S2**




*Result Table (Uncal - F:\N 2 - Detector 3)*

| | Reten. Time [min] | Area [mAU.s] | Height [mAU] | Area [%] | Height [%] | W05 [min] | Compound Name |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.470 | 7427.582 | 587.499 | 39.2 | 37.7 | 0.24 | |
| 2 | 3.527 | 11517.190 | 972.852 | 60.8 | 62.3 | 0.21 | |
| | Total | 18944.772 | 1560.351 | 100.0 | 100.0 | | |

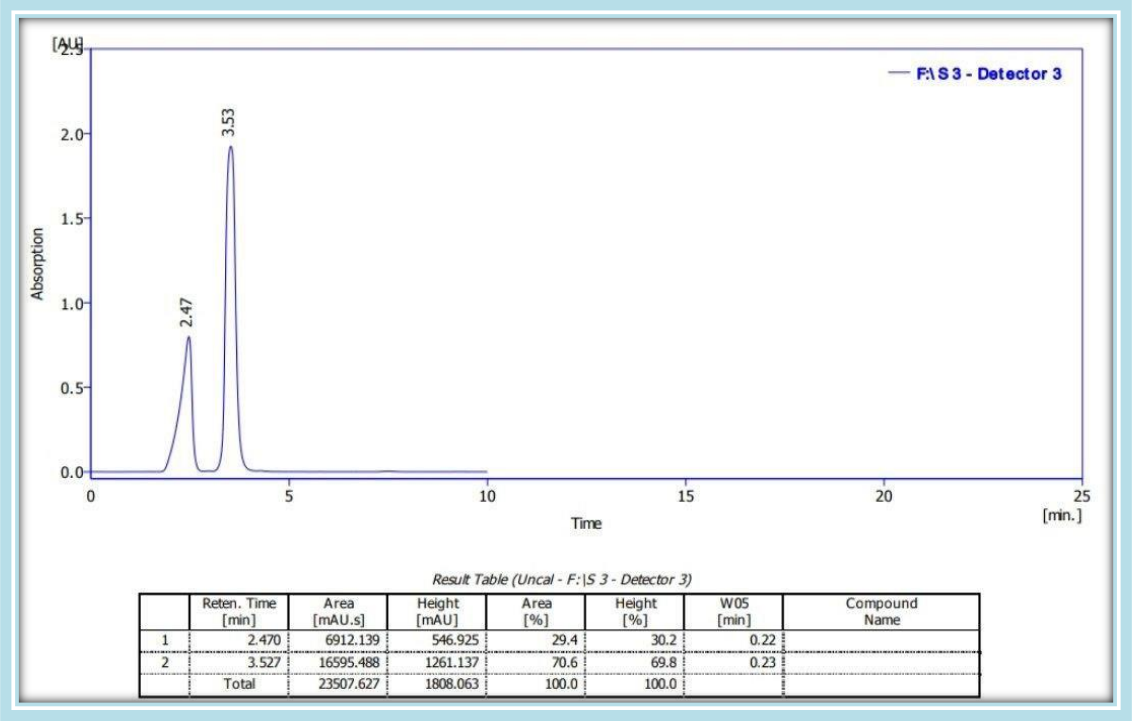
**الشكل (15) التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.N2**




*Result Table (Uncal - F:\H 9 - Detector 3)*

| | Reten. Time [min] | Area [mAU.s] | Height [mAU] | Area [%] | Height [%] | W05 [min] | Compound Name |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.470 | 7798.504 | 597.789 | 32.0 | 32.5 | 0.24 | |
| 2 | 3.527 | 16589.284 | 1242.440 | 68.0 | 67.5 | 0.23 | |
| | Total | 24387.789 | 1840.229 | 100.0 | 100.0 | | |

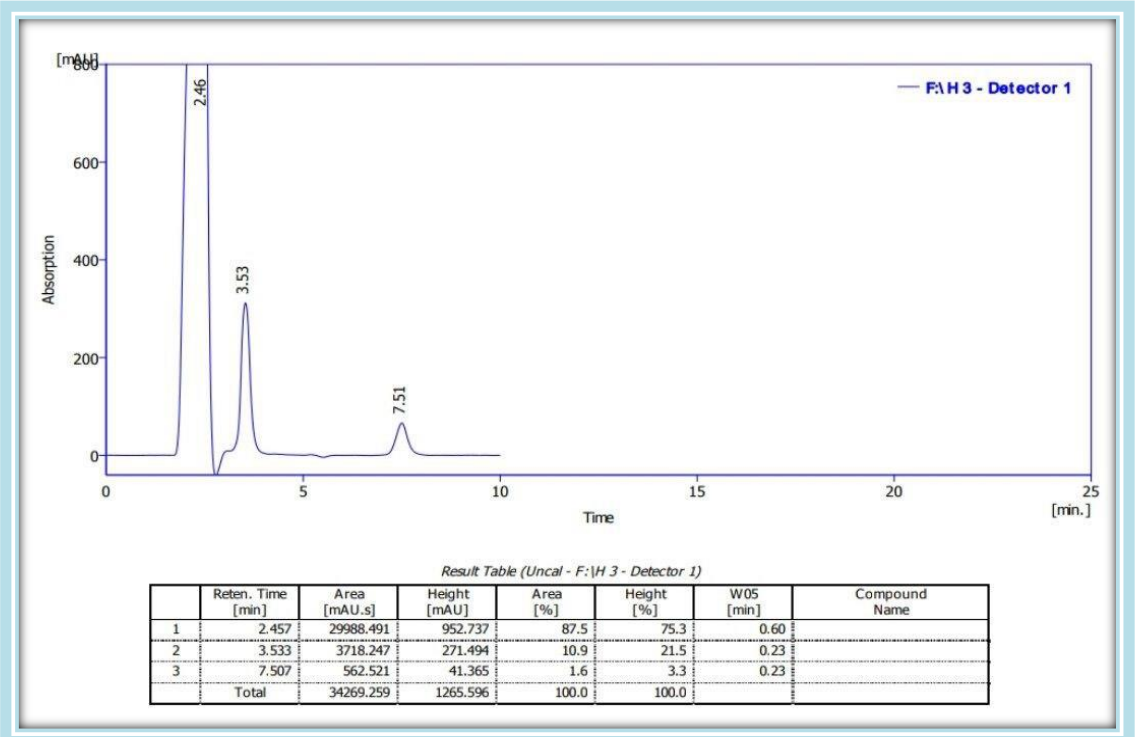
**الشكل (16) التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.H9**




*Result Table (Uncal - F:\S 3 - Detector 3)*

| | Reten. Time [min] | Area [mAU.s] | Height [mAU] | Area [%] | Height [%] | W05 [min] | Compound Name |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.470 | 6912.139 | 546.925 | 29.4 | 30.2 | 0.22 | |
| 2 | 3.527 | 16595.488 | 1261.137 | 70.6 | 69.8 | 0.23 | |
| | Total | 23507.627 | 1808.063 | 100.0 | 100.0 | | |

**الشكل (17) التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.S3**




*Result Table (Uncal - F:\H 3 - Detector 1)*

| | Reten. Time [min] | Area [mAU.s] | Height [mAU] | Area [%] | Height [%] | W05 [min] | Compound Name |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.457 | 29988.491 | 952.737 | 87.5 | 75.3 | 0.60 | |
| 2 | 3.533 | 3718.247 | 271.494 | 10.9 | 21.5 | 0.23 | |
| 3 | 7.507 | 562.521 | 41.365 | 1.6 | 3.3 | 0.23 | |
| | Total | 34269.259 | 1265.596 | 100.0 | 100.0 | | |

**الشكل (18) التقدير الكمي والنوعي لسم الفطري Trichodermin للعزلة T.H3**

## 7-4 تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلات الفطر *Trichoderma spp* المعزولة من منطقة الرايزوسفير .

اكدت نتائج تحليل التتابع النيوكليتيدي لتسعِ عزلات من الفطر *Trichoderma spp* التي عزلت من منطقة الرايزوسفير النباتات تشخيصها الى عدة انواع متباينة حيث ظهر أنَّ العزلات تعود للفطر *Trichoderma spp* .وتم تسجيل جميع العزلات في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية NCBI وتحت الرموز الخاصة المبينة ازاء كل منها والمذكورة في الجدول 18. كما أجريت التحاليل النيوكليوتيدية باستعمال برنامج MEGA لتحليل العزلات ورسم شجرة القرابة بين كل من هذه العزلات والعزلات المشابهة لها المسجلة في مركز NCBI حيث تم بناؤها من التسلسل الجزيئي النيوكليوتيدي لمنطقة SSU العائدة لكل من هذه العزلات .

**جدول (18) العزلات الفطرية للفطر *Trichoderma* spp المشخصة**

| ت | رمز العزلة | نوع العزلة الفطرية | رقم الايداع في NCBI |
|---|---|---|---|
| 1 | *YSB6* | *Trichoderma reesei* | MZ837930 |
| 2 | *YSD2* | *Trichoderma reesei* | MZ831521 |
| 3 | *YSD8* | *T.pseudokoningii* | MZ837929 |
| 4 | *YSH3* | *Trichoderma reesei* | MZ970766 |
| 5 | *YSH9* | *Trichoderma viride* | MZ970842 |
| 6 | *YSN2* | *Trichoderma harzianum* | MZ994502 |
| 7 | *YSS2* | *Trichoderma asperellum* | MZ970841 |
| 8 | *YSS3* | *Trichoderma reesei* | MZ970840 |
| 9 | *YSS10* | *Trichoderma reesei* | MZ994500 |

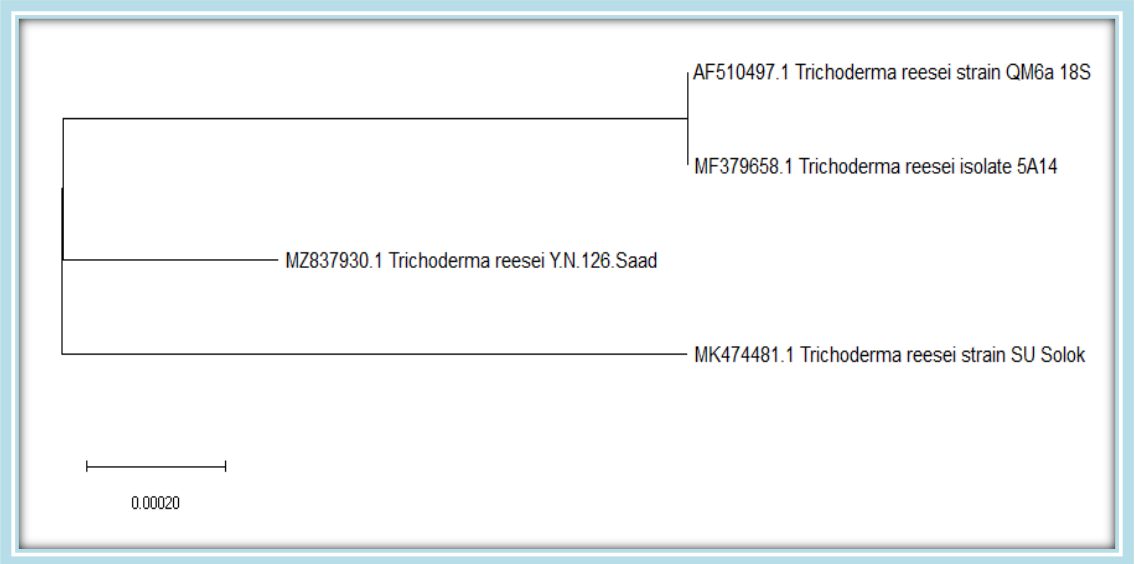
### 1-7-4 تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة *Trichoderma reesei Y.N.126.Saad*. المعزولة من محافظة بغداد

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر Y.N126. T.Saad المعزول من محافظة بغداد مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية

(NCBI ) أنَّ نسبة التشابه الوراثي بلغت (100%) مع العزلتين البرازيل (MF379658) و الالمانية ( MH047196) وبلغت نسبة التشابه الوراثي مع العزلة الالمانية (AF510497) (99.82%) في حين كانت النسبة 99.70 % مع عزلة اندونيسيا (MK474481 )(جدول19) وأظهر الشكل (18) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة ( Y.N.126.Saad ) تقع في تفرعات منفصلة clades عن جميع العزلات .

**الجدول (19) عزلات الفطر *Trichoderma reesei .Y.N.126.Saad* المستخدمة في الشجرة الوراثية**

| Sequence similarity % | **GenBank Accession Number** | مكان العزلة **Origin** | رمز العزلة **Isolate name** | اسم الفطر **Fungal name** | ت |
|---|---|---|---|---|---|
| %100 | MZ837930 | Iraq | Y.N.126.Saad | ***Trichoderma reesei*** | 1 |
| %100 | MH047196 | Germany | 18S | ***Trichoderma reesei*** | 2 |
| %100 | MF379658 | Brazil | 5A14 | ***Trichoderma reesei*** | 3 |
| %99.98 | CP020878 | Taiwan | CBS999.97 | ***Trichoderma reesei*** | 4 |
| %99.82 | AF510497 | Germany | QM6a 18S | ***Trichoderma reesei*** | 5 |
| % 99. 70 | MK474481 | Indonesia | SU_Solok | ***Trichoderma reesei*** | 6 |



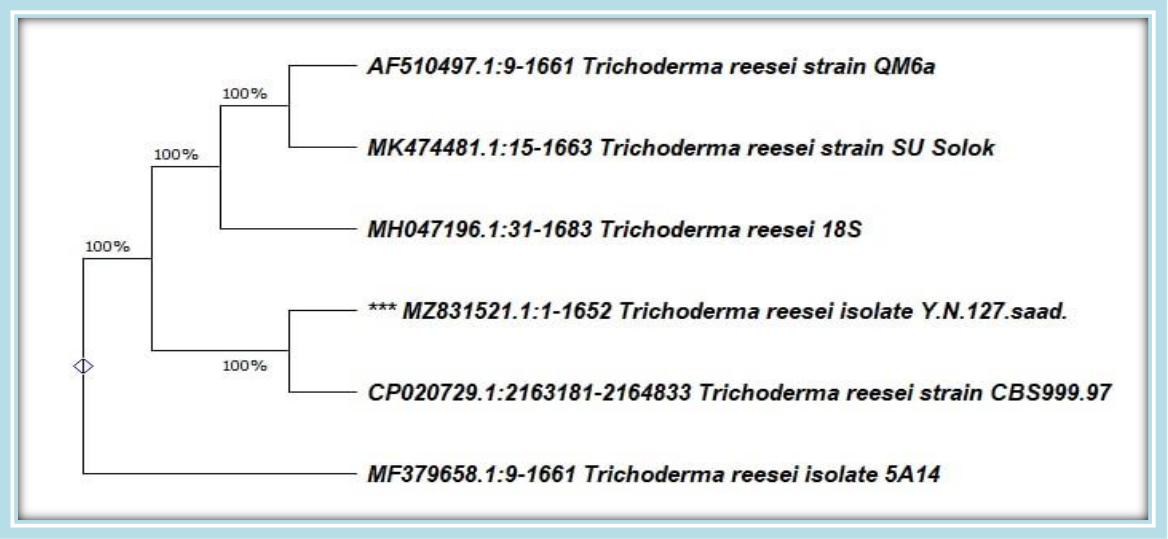

**الشكل (19) : يمثل الشجرة الوراثية للفطر *Trichoderma reesei .Y.N.126.Saad* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ837930**

### 2-7-4 تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة *Trichoderma reesei .Y.N.127.Saad* المعزولة من محافظة الديوانية

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر.T.Y.N127 المعزول من محافظة الديوانية مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية (NCBI ) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت 100% مع عزلة تايوان (CP020729.1)وبنسبه (99.98%) مع عزلة البرازيل (MF379658) وبلغت نسبة التشابه الوراثي مع العزلتين م الالمانية (AF510497) (MH047196) 99.82% في حين كانت النسبة 99.70 % مع عزلة اندونيسيا (MK474481 )(جدول 19 ) وأظهر الشكل( 19) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة ( Y.N.127.Saad ) اظهرت التفرع نفسة مع العزلة تايوان بتفرعات منفصلة clades عن العزلات الاخرى .

**جدول (20) عزلات الفطر *Trichoderma reesei .Y.N.127.Saad* المستخدمة في الشجرة الوراثية**

| Sequence similarity % | **GenBank Accession Number** | مكان العزلة **Origin** | رمز العزلة **Isolate name** | اسم الفطر **Fungal name** | ت |
|---|---|---|---|---|---|
| 100 | MZ837929 | Iraq | Y.N.127.Saad | ***Trichoderma reesei*** | 1 |
| 99.82 | MH047196 | Germany | 18S | ***Trichoderma reesei*** | 2 |
| 99.98 | MF379658 | Brazil | 5A14 | ***Trichoderma reesei*** | 3 |
| 100 | CP020729.1 | Taiwan | CBS999.97 | ***Trichoderma reesei*** | 4 |
| 99. 70 | MK474481 | Indonesia | SU_Solok | ***Trichoderma reesei*** | 5 |
| 99.82 | AF510497.1 | Germany | strain QM6a | ***Trichoderma reesei*** | 6 |



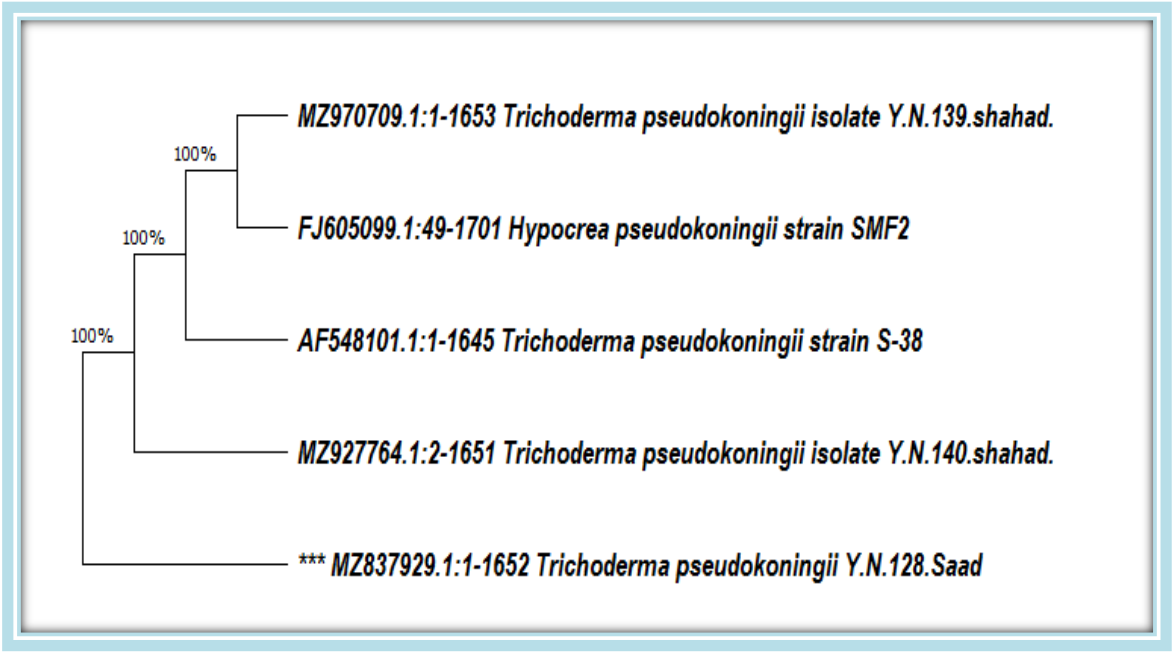

**الشكل (20) الشجرة الوراثية للفطر *Trichoderma reesei .Y.N.127.Saad* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ831521**

## 3-7-4 تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة *T.pseudokoningii.Y.N.128.Saad* المعزولة من محافظة القادسية

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر T. Y.N128. المعزول من محافظة الديوانية مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (99.94%) مع عزلتي الفطر *Trichoderma pseudokoningii* المعزولة من العراق والسويد (MZ927764.1)(AF548101.1 ) و بلغت نسبة التشابه الوراثي مع العزلة الصينية (FJ605099.1 ) (99.74 %) في حين كانت النسبة 99.70 % مع العزلة العراقية (MZ970709 )(جدول20) وأظهر الشكل (20) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة ( Y.N.128.Saad ) اظهرت فيها العزلة Y.N.128.Saad تفرعلاً منفصلاً عن جميع العزلات

جدول (21) عزلات الفطر *T.pseudokoningii.Y.N.128.Saad* المستخدمة في الشجرة الوراثية

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



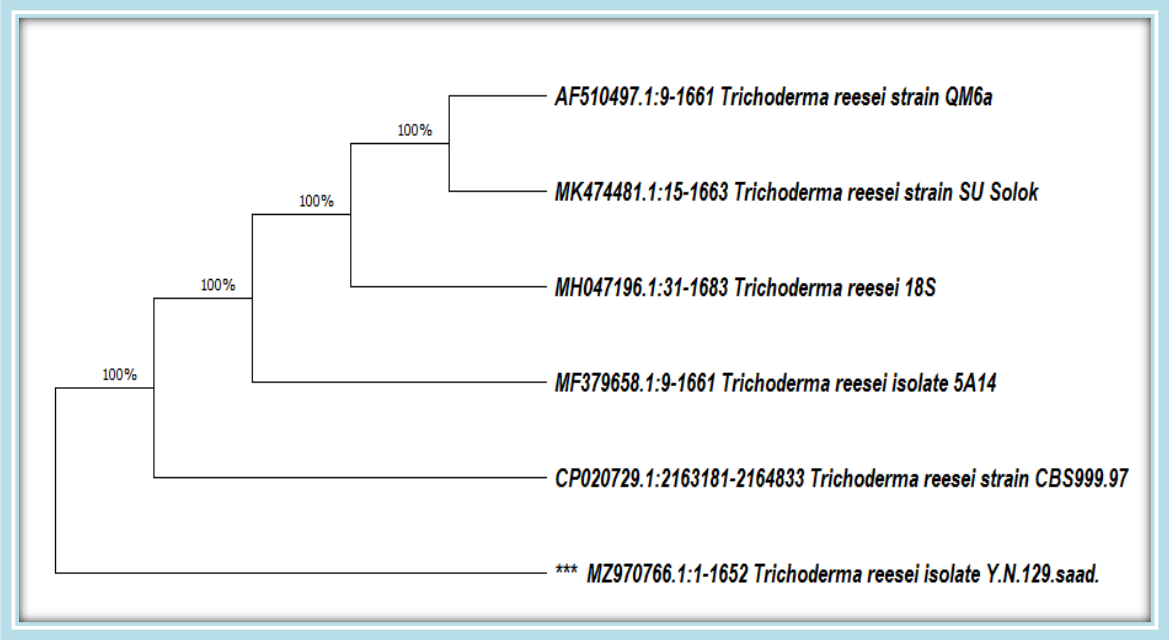

الشكل(21) الشجرة الوراثية للفطر *T.pseudokoningii.Y.N.128.Saad* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ837929

### 4-7-4 تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة *Trichoderma reesei .Y.N.129.Saad* المعزولة من محافظة بابل

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر .Y.N129 T.Saad المعزول من محافظة بابل مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية (NCBI ) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (99.98%) مع العزلة البرازيلية (MF379658) وبلغت نسبة التشابه الوراثي (99.82%) مع العزلات الالمانية و تايوان (MH047196) (AF510497.1) (CP020729.1) في حين كانت النسبة 99.70 % مع المعزولة من اندونيسيا (MK474481 )(جدول 21 ) وأظهر الشكل (21) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة (Y.N.129.Saad ) تقع في تفرعات منفصلة clades عن جميع العزلات

**جدول (22) عزلات الفطر*Trichoderma reesei .Y.N.129.Saad* المستخدمة في الشجرة الوراثية**

| ت | اسم الفطر Fungal name | رمز العزلة Isolate name | مكان العزلة Origin | GenBank Accession Number | Sequence similarity % |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | *Trichoderma reesei* | Y.N.129.Saad | Iraq | MZ970766 | %100 |
| 2 | *Trichoderma reesei* | 18S | Germany | MH047196 | %99.82 |
| 3 | *Trichoderma reesei* | 5A14 | Brazil | MF379658 | %99.98 |
| 4 | *Trichoderma reesei* | CBS999.97 | Taiwan | CP020729 | %99.82 |
| 5 | *Trichoderma reesei* | SU_Solok | Indonesia | MK474481 | % 99. 70 |
| 6 | *Trichoderma reesei* | strain QM6a | Germay | AF510497 | %99.82 |




**الشكل(22) الشجرة الوراثية للفطر *Trichoderma reesei .Y.N.129.Saad* المسجل في NCBI**

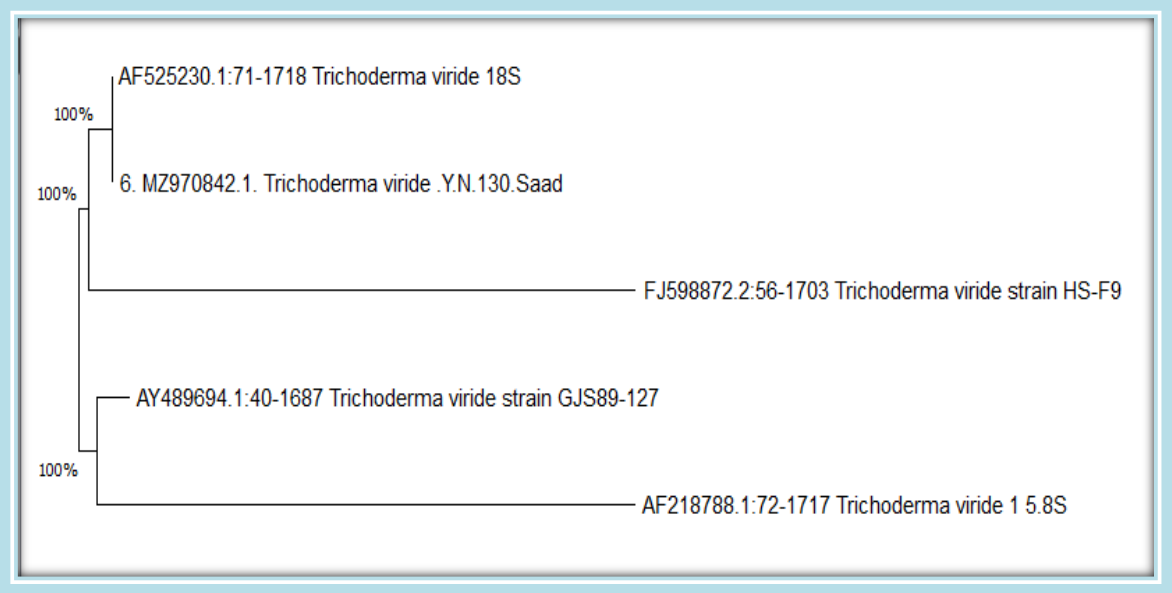
**تحت رقم الانضمام MZ970766**

### 5-7-4 تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة *Trichoderma viride .Y.N.130.Saad* المعزولة من محافظة بابل

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر .Y.N130 T.Saad المعزول من محافظة بابل مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية (NCBI ) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت نسبة التشابه الوراثي مع العزلة الصينية (AF525230) (99.82%) في حين كانت النسبة 99.70 % مع العزلة الامريكية ( AY489694 ) و كانت نسبة التشابه مع العزلة الصينية (FJ598872) وبلغت مع 99.09% مع العزلة الاسترالية (جدول23 ) وأظهرالشكل (22) بأن العزلة Y.N.130.Saad تقع في التفرع نفسة مع العزلة الصينية (AF525230) وضمن تفرعات منفصلة clades عن العزلات الاخرى .

جدول (23) عزلات الفطر *Trichoderma viride .Y.N.130.Saad* المستخدمة في الشجرة الوراثية

| Sequence similarity % | GenBank Accession Number | مكان العزلة Origin | رمز العزلة Isolate name | اسم الفطر Fungal name | ت |
|---|---|---|---|---|---|
| %100 | *MZ970842* | Iraq | *Y.N.130.Saad* | *Trichoderma viride* | 1 |
| %99.82 | *AF525230* | China | 18S | *Trichoderma viride* | 2 |
| % 99.70 | *AY489694* | USA | GJS89-127 | *Trichoderma viride* | 3 |
| %99.15 | *FJ598872* | China | HS-F9 | *Trichoderma viride* | 4 |
| %99.09 | *AF218788* | Australia | 1, 5.8S | *Trichoderma viride* | 5 |



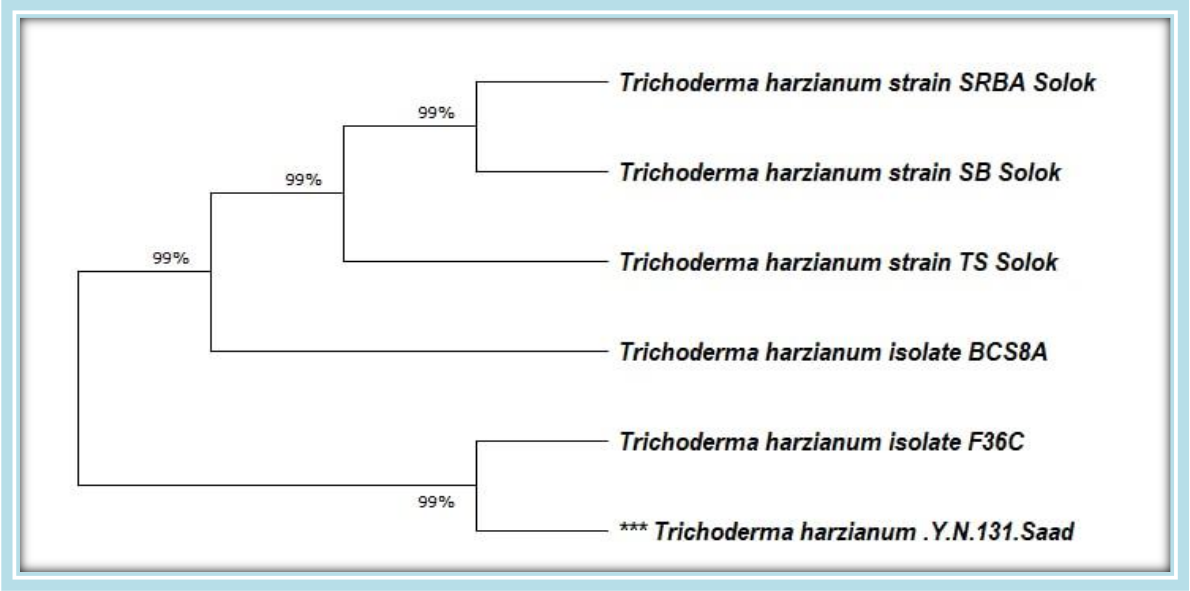

الشكل(23) الشجرة الوراثية للفطر*Trichoderma viride .Y.N.130.Saad* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ970842

### 6-7-4 تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة *Trichoderma harzianum* *Y.N.131.Saad*. المعزولة من محافظة النجف

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر .Y.N131 T.Saad المعزول من محافظة النجف مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية (NCBI ) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت 99.70% مع العزلة الهندية (MW158368.1) وبلغت نسبة التشابه الوراثي مع العزلات الاخرى 99.51% (جدول 24 ) وأظهر الشكل (23) بأن العزلة ( Y.N.131.Saad ) تنحدر من نفس الاصل الجيني للعزلة الهندية وبتفرعات جينية منفصلة clades عن العزلات الاخرى .

**جدول (24) عزلة الفطر*Trichoderma harzianum .Y.N.131.Saad* المستخدمة في الشجرة الوراثية**

| ت | اسم الفطر Fungal name | رمز العزلة Isolate name | مكان العزلة Origin | GenBank Accession Number | Sequence similarity % |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | *Trichoderma harzianum* | Y.N.131.Saad | Iraq | MZ994502 | %100 |
| 2 | *Trichoderma harzianum* | BCS8A | Kenya | MH015010 | %99.51 |
| 3 | *Trichoderma harzianum* | F36C | India | MW158368 | %99.70 |
| 4 | *Trichoderma harzianum* | TS_Solok | Indonesia | MK474478 | % 99.51 |
| 5 | *Trichoderma harzianum* | SRBA_Solok | Indonesia | MK474477 | % 99.51 |
| 6 | *Trichoderma harzianum* | SB_Solok | Indonesia | MK474476 | % 99.51 |



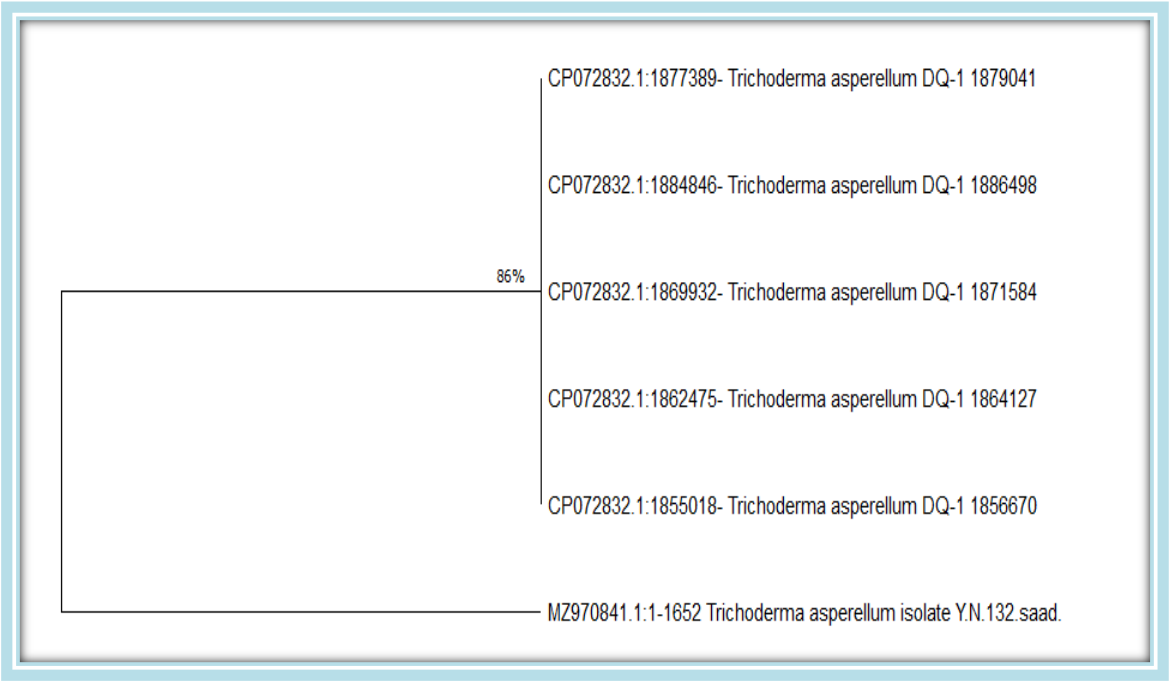

**الشكل(24) الشجرة الوراثية للفطر *Trichoderma harzianum .Y.N.131.Saad* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ994502**

## 7-7-4 تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة *Trichoderma asperellum.* Y.N.132.Saad المعزولة من محافظة ذي قار

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر .Y.N132 T.Saad المعزول من محافظة ذي قار مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية NCBI أنَّ نسبة التشابه الوراثي بلغت 99.94% مع جميع العزلات الموضحة في الجدول(25) وأظهر الشكل (25) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة ( Y.N.132.Saad) لاتشترك مع العزلات الاخرى في التفرع الجيني .

جدول (25) عزلات الفطر *Trichoderma asperellum. Y.N.132.Saad* المستخدمة في الشجرة الوراثية

| Sequence similarity % | GenBank Accession Number | مكان العزلة Origin | رمز العزلة Isolate name | اسم الفطر Fungal name | ت |
|---|---|---|---|---|---|
| %100 | MZ970841 | iraq | Y.N.132.Saad | *Trichoderma asperellum* | 1 |
| %99.94 | CP072832.1 | China | 1879041 | *Trichoderma asperellum* | 2 |
| %99.94 | CP072832.1 | China | 1886498 | *Trichoderma asperellum* | 3 |
| %99.94 | CP072832.1 | China | 1871584 | *Trichoderma asperellum* | 4 |
| %99.94 | CP072832.1 | China | 1864127 | *Trichoderma asperellum* | 5 |
| %99.94 | CP072832.1 | China | 1856670 | *Trichoderma asperellum* | 6 |



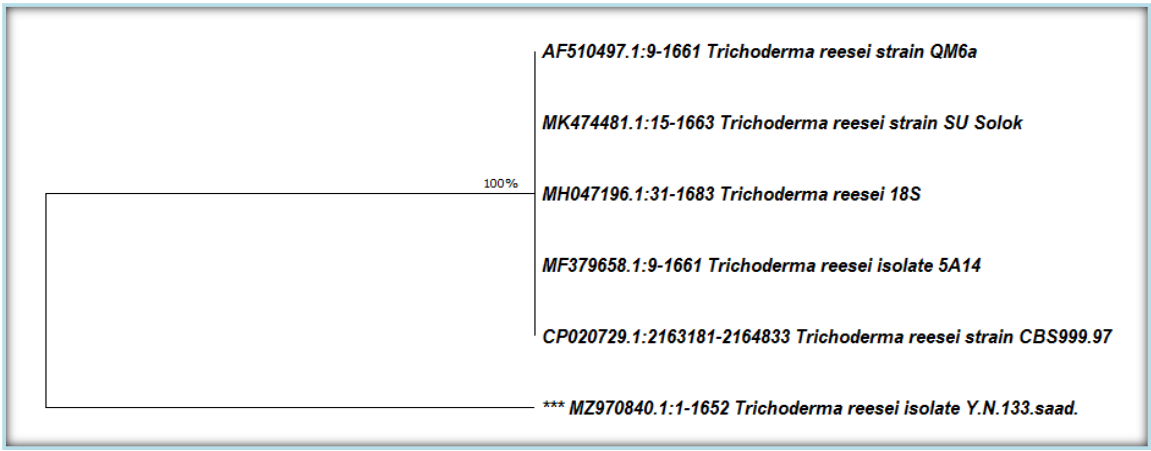

الشكل(25) الشجرة الوراثية للفطر *Trichoderma asperellum. Y.N.132.Saad* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ970841

### 8-7-4 تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة *Trichoderma reesei .Y.N.133.Saad* المعزولة من محافظة ذي قار

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر .Y.N129 T.Saad المعزول من محافظة ذي قار مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية NCBI أن نسبة التشابه الوراثي بلغت 99.98% مع العزلة البرازيلية (MF379658) وبلغت نسبة التشابه الوراثي 99.82% مع العزلات الالمانية و تايوان (MH047196) (AF510497.1 )(CP020729.1) في حين كانت النسبة 99.70 % مع المعزولة من اندونيسيا (MK474481 )(جدول 26 )الشكل (25) يبين بأن العزلة ( Y.N.129.Saad ) لا تشترك مع العزلات بنفس الانحدار الجيني .

**جدول (26) عزلات الفطر *Trichoderma reesei .Y.N.133.Saad* المستخدمة في الشجرة الوراثية**

| ت | اسم الفطر **Fungal name** | رمز العزلة **Isolate name** | مكان العزلة **Origin** | **GenBank Accession Number** | Sequence similarity % |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | ***Trichoderma reesei*** | Y.N.133.Saad | Iraq | MZ970840 | %100 |
| 2 | ***Trichoderma reesei*** | 18S | Germany | MH047196 | %99.82 |
| 3 | ***Trichoderma reesei*** | 5A14 | Brazil | MF379658 | %99.98 |
| 4 | ***Trichoderma reesei*** | CBS999.97 | Taiwan | CP020729.1 | %99.82 |
| 5 | ***Trichoderma reesei*** | SU_Solok | Indonesia | MK474481 | % 99. 70 |
| 6 | ***Trichoderma reesei*** | strain QM6a | Germany | AF510497.1 | %99.82 |



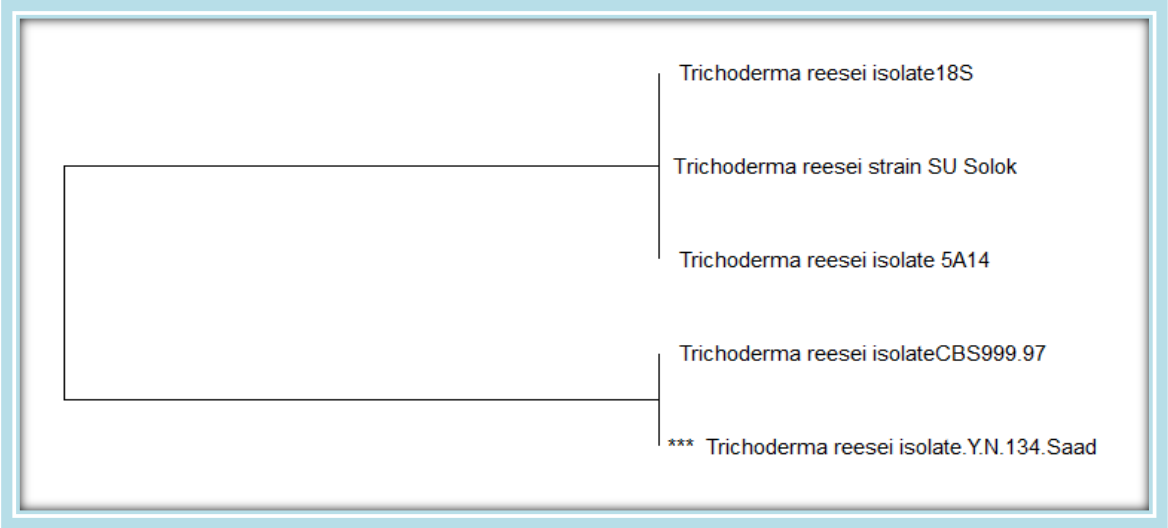

**الشكل(26) الشجرة الوراثية للفطر *Trichoderma reesei .Y.N.133.Saad* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ837930**

## 9-7-4 تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلة *Trichoderma reesei Y.N.134.Saad*. المعزولة من محافظة ذي قار

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر .Y.N129 T.Saad المعزول من محافظة ذي قار مع البيانات المتوفرة في المركز المعلومات التقنية الحيوية (NCBI ) أنَّ نسبة التشابه الوراثي بلغت 100% مع العزلة البرازيلية (MF379658) و العزلة الالمانية (MH047196) وبلغت نسبة التشابه الوراثي 99.98% مع عزلة تايوان (CP020729.1) في حين كانت النسبة 99.70 % مع المعزولة من اندونيسيا (MK474481) (جدول 26 ) وأظهر الشكل (26) بأن العزلة (Y.N.134.Saad ) اظهرت تفرع مشترك مع عزلة تايوان وبتفرعات منفصلة clades عن العزلات الاخرى.

جدول (27) عزلات الفطر *Trichoderma reesei .Y.N.134.Saad* لمستخدمة في الشجرة الوراثية

| ت | اسم الفطر Fungal name | رمز العزلة Isolate name | مكان العزلة Origin | GenBank Accession Number | Sequence similarity % |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | *Trichoderma reesei* | Y.N.134.Saad | Iraq | MZ994500 | %100 |
| 2 | *Trichoderma reesei* | 18S | Germany | MH047196 | %100 |
| 3 | *Trichoderma reesei* | 5A14 | Brazil | MF379658 | %100 |
| 4 | *Trichoderma reesei* | CBS999.97 | Taiwan | CP020878 | %99.98 |
| 6 | *Trichoderma reesei* | SU_Solok | Negeri | MK474481 | % 99. 70 |




الشكل(27) الشجرة الوراثية للفطر*Trichoderma reesei .Y.N.134.Saad* المسجل في NCBI تحت رقم الانضمام MZ994500

## 4ـ 8 الخصائص الكيميائية للتربة Soil chemical properties المعزول منها عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* spp المنتخبة

اظهرت نتائج تحليل pH التربة اختلافاً معنوياً بين العينات وتراوحت نسبة pH بين 4-7.4 اما ملوحة التربة فقد تراوحت بين 1.3-9 ديسي سيمز- م$^{-1}$ حيث اختلفت معنويا في قيمة EC لتربة التي عزلت منها العزلات الفطرية اما نسبة المادة العضوية فكانت هناك اختلافات معنوية بين النسب للمادة العضوية التي تراوحت بين 13 – 26 % وذكر Singh واخرون (2014) ان الاس

الهيدروجيني المثالي لنمو انواع الفطر *Trichoderma* spp يتراوح بين 5.5-7 . بينما اشار الاسدي (2020) ان عزلات من الفطر *Trichoderma* spp تستطيع النمو في مستويات ملحية مختلفة ولكن بشكل متباين مع ملاحظة عدم تأثر بعضها بأي مستويات ملحية وعدم اختلافها عن معاملة المقارنة .وفي دراسة اخرى ذكر Poosapati واخرون (2014) قدره عزلات الفطر *T.asperellum* تحمل الظروف غير الملائمة ومنها مستويات الملحية العالية وهذه الدراسات تؤكد ماتم الحصول علية من عزل انواع الفطر *Trichoderma* spp ضمن درجات pH وملوحة تربة المختلفة وكذلك التباين في المحتوى العضوي .

**جدول(28) الخصائص الكيميائية للترب المعزول منها عزلات الفطر *Trichoderma* spp**

| ت | العزلات الفطرية | فاعلية التربة (PH) | ايصالية التربة (EC) دسيميز-م$^{-1}$ | المحتوى من المواد العضوية غم /تربة |
|---|---|---|---|---|
| 1 | العزلة T.B6 | 5.00 | 1.70 | 21.0 |
| 2 | العزلة T.D2 | 7.00 | 2.00 | 16.0 |
| 3 | العزلة T.D8 | 6.50 | 1.90 | 18.0 |
| 4 | العزلة T.H 3 | 7.40 | 2.26 | 23.0 |
| 5 | العزلة T.H 9 | 6.90 | 3.00 | 19.0 |
| 6 | العزلة T.N 2 | 6.60 | 9.00 | 26.2 |
| 7 | العزلة T.S2 | 7.80 | 2.50 | 13.0 |
| 8 | العزلة T.S 3 | 6.00 | 3.10 | 16.0 |
| 9 | العزلة T.S 10 | 7.40 | 2.00 | 14.0 |
| | L.S.D. ….(0.05) | 1.398 | 1.153 | 4.188 |

*كل رقم في الجدول يمثل ثلاث مكررات

## 4-9 اختبار التضاد الحيوي لعدد من عزلات الفطر *Trichoderma* spp المنتجة للسم الفطري Trichodermin ومنظمات النمو فيما بينها مختبريا على وسط PDA

اظهرت نتائج التضاد بين العزلات الفطرية الخمسة المختبره على وسط PDA في اطباق بتري عدم وجود تضاد بين العزلات T.H9,T.N2,T.B6 واظهرت العزلتين T.D8 T.H3,تضاد حيوي بينها وبين العزلات الاخرى ذكر الاسدي (2020) في دراسة سابقة لا يوجد تضاد بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp

## 4- 10 اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp المنتجة للسم الفطري Trichodermin و منظمات النمو ضد العزلات الفطرية الممرضة حقلياً في الاصص البلاستيكية .

### 4-10-1 التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp ضد العزلة الفطر الممرض *M.phaseolina* حقلياً في الاصص البلاستيكية

اظهرت نتائج الجدول (29) ان جميع المعاملات اثرت بشكل معنوي في زيادة نسبة الانبات مقارنة بمعاملة الفطر الممرض فقط التي بلغت 50 % . عدا معاملة T.N2 + الفطر الممرض التي لم تؤثر بشكل معنوي . حققت المعاملات التوليفة اعلى زيادة في النسبة المئوية لإنبات بذور الباميا 88.8% والتي تفوقت على المعاملة المنفردة .ولم تختلف جميع المعاملات معنويا مع معاملة التربة بدون اضافة .اما النسبة المئوية لموت البادرات فحققت جميع المعاملات خفض معنوي لنسبة موت البادرات التي تتراوح بين 0.00-30.5 % في حين بلغت المعاملة للفطر الممرض فقط 50 % ..

**جدول (29) التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* ضد العزلة الفطر الممرض *M.phaseolina* حقلياً في الاصص البلاستيكية .**

| ت | المعاملات | النسبة المئوية للانبات | النسبة المئوية لموت البادرات |
|---|---|---|---|
| 1 | المقارنة1 بدون اضافة أي فطر | % 90 | %0.00 |
| 2 | المقارنة2 اضافة الممرض فقط | % 50 | %50 |
| 3 | اضافة العزلة (T. N2) + الممرض | %63.8 | %30.5 |
| 4 | اضافة العزلة (T. B6) + الممرض | %77.7 | %26 |
| 5 | اضافة العزلة (T. H9) + الممرض | %80.5 | %15 |
| 6 | اضافة العزلة (T. N2) + (T. B6) + الممرض . | %86.8 | %0.00 |
| 7 | اضافة العزلة (T. N2) + (T. H9)) + الممرض | %88.8 | %0.00 |
| 8 | اضافة العزلة (T. H9) + (T. B6) + الممرض | % 86.8 | %0.00 |
| 9 | اضافة العزلة (T. H9) + (T. B6) +(T.N2) + الممرض | %88.8 | %0.00 |
| | L.S.D. ….(0.05) | 23.926 | 1.79 |

*كل رقم في الجدول يمثل ثلاث مكررات

اظهرت نتائج الجدول (30) أنَّ جميع المعاملات اثرت بشكل معنوي في وزن النبات الذي تراوح بين 0.6 -1 غم قياسا بمعاملة الفطر الممرض فقط التي بلغت 0.5 غم عدا معاملة T.B6 التي لم تأثر بشكل معنوي . اما المقارنة بمعاملة التربة فقد بلغت 0.7غم بينما اثرت المعاملتين T.B6+T.N2+T.H9وT.B6+T.N2 بشكل معنوي اذ بلغت 0.98 و1 غم اما طول النبات فقد اثرت جميع المعاملات تأثيراً معنوياً على طول النبات والذي تراوح بين 18-24 سم

قياسا بمعاملة الفطر الممرض فقط التي بلغت 15 سم ، و حققت جميع المعاملات ماعدا T.B6 و T.H9 تأثيراً معنوياً قياسا بمعاملة التربة فقط التي بلغت 17 سم .

اما طول الجذر لم يكن هناك تأثير معنوي على طول الجذر الذي تراوح بين 2-3 سم قياسا بمعاملة الفطر الممرض الذي كان 1.5 سم و معاملة التربة فقط التي كانت 1.8سم .واوضحت النتائج تأثير المعاملات معنويا على طول المجموع الخضري عدا T.B6 والتي تراوحت بين 16-21 سم قياسا بمعاملة الفطر فقط التي بلغت 13.5 سم اما المعاملات التوليفة بين العزلات فقط اثرت بشكل معنوي على وزن النبات قياساً بمعاملة التربة فقط التي بلغت 15.2 سم.

**جدول (30) التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma sp* على بعض صفات النمو لبادرات الباميا**

| ت | المعاملات | وزن النبات غم/ نبات | طول النبات سم | طول الجذر سم | طول المجموع الخضري سم |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | (المقارنة1) بدون اضافة أي فطر | 0.7 | 17 | 1.8 | 15.2 |
| 2 | (المقارنة2) اضافة الممرض فقط | 0.5 | 15 | 1.5 | 13.5 |
| 3 | اضافة العزلة (T. N2) + الممرض | 0.7 | 20 | 3 | 17 |
| 4 | اضافة العزلة (T. B6) + الممرض | 0.6 | 18 | 2 | 16 |
| 5 | اضافة العزلة (T. H9) + الممرض | 0.7 | 18 | 1.5 | 16.5 |
| 6 | اضافة العزلة (T. N2) + (T. B6) + الممرض . | 0.98 | 23 | 2 | 21 |
| 7 | اضافة العزلة (T. N2) + ((T. H9)) + الممرض | 0.88 | 23 | 3 | 20 |
| 8 | اضافة العزلة (T. B6) + (T. H9) + الممرض | 0.83 | 22 | 2 | 20 |
| 9 | اضافة (T. H9) + (T. B6) +(T.N2) + الممرض | 1 | 24 | 3 | 21 |
| | L.S.D. ….(0.05) | 0.190 | 2.050 | 1.542 | 2.819 |

*كل رقم في الجدول يمثل ثلاث مكررات

**2-10-4 التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp ضد العزلة الفطر للممرض *Fusarium* sp حقلياً في الاصص البلاستيكية .**

حيث اظهرت هذه النتائج الموضحة في الجدول (31) أنَّ جميع المعاملات حققت زيادة معنوية كبيرة في تأثيرها على النسبة المئوية لأنبات بذور الباميا التي تراوحت بين 72.2-88.8 % قياسا مع المعاملة الممرض فقط التي كانت 55.5 % ولم تظهر فرقاً معنوياً مع معاملة بدون اضافة اي فطرالتي كانت 90 %.اما النسبة المئوية لموت البادرات فحققت جميع المعاملات فرقاً معنوياً عالياً

تراوح بين 0.00-23 % في حين بلغت في المقارنة للفطر الممرض فقط 41 % ومقارنة التربة لم تظهر اي فرق معنوي مع معاملة بدون اضافة 0.00%.

**جدول (31) التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp ضد العزلة الفطر الممرض *Fusarium sp* حقلياً في الاصص البلاستيكية .**

| ت | المعاملات | النسبة المئوية للانبات | النسبة المئوية لموت البادرات |
|---|---|---|---|
| 1 | (المقارنة1) بدون اضافة أي فطر | %90 | %0.00 |
| 2 | (المقارنة2) اضافة الممرض فقط | %55.5 | %41 |
| 3 | اضافة العزلة (T. N2) + الممرض | %75.2 | %14.8 |
| 4 | اضافة العزلة (T. B6) + الممرض | %72.2 | %23 |
| 5 | اضافة العزلة (T. H9) + الممرض | %83.3 | %13 |
| 6 | اضافة العزلة (T. N2) + (T. B6) + الممرض . | %86.1 | %0.00 |
| 7 | اضافة العزلة (T. N2) + ((T. H9)) + الممرض | %83.3 | %0.00 |
| 8 | اضافة العزلة (T. H9) + (T. B6) + الممرض | %80.5 | %0.00 |
| 9 | اضافة العزلة (T. H9) + (T. B6) +(T.N2)+ الممرض | %88.8 | %0.00 |
| | L.S.D. ….(0.05) | 2.074 | 2.370 |

*كل رقم في الجدول يمثل ثلاث مكررات

بينت النتائج في الجدول (32) تأثير جميع المعاملات بشكل معنوي على وزن النبات الذي تراوح بين 0.77 -1.07 غم قياسا بمعاملة الفطر الممرض فقط التي بلغت0.39 غم وكذلك اظهرت جميع المعاملات تأثيراً معنوياً على وزن النبات عدا المعاملة T.N2 قياساً بمعاملة التربة فقط التي بلغت 0.7 غم اما طول النبات فقد اثرت جميع المعاملات تأثيراً معنوياً على طول النبات والذي تراوح بين 20-28 سم قياساً بمعاملة الفطر الممرض فقط التي بلغت 11.5 سم ومعاملة التربة فقط التي بلغت 17 سم .اما طول الجذر فكان هناك تأثيرٌ معنويٌ على طول الجذر الذي تراوح بين 2.5-4 سم قياسا بمعاملة الفطر الممرض الذي كان 1.5 سم و معاملة بدون اضافة التي كانت 1.6 سم .واوضحت النتائج تأثيرٌ جميع المعاملات معنوياً على طول المجموع الخضري والتي تراوحت بين 17-25 سم قياساً بمعاملة الفطر الممرض فقط التي بلغت 10سم كما اثرت جميع المعاملات بشكل معنوي عدا T.N2 قياسا بمعاملة التربة فقط والتي بلغت 15.4.

**جدول (32)التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma spp* على صفات النمو لبادرات الباميا**

| ت | المعاملات | وزن النبات غم/ نبات | طول النبات سم | طول الجذر سم | طول المجموع الخضري سم |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | المقارنة1 بدون اضافة أي فطر | 0.7 | 17 | 1.6 | 15.4 |
| 2 | المقارنة2 اضافة الممرض فقط | 0.39 | 11.5 | 1.5 | 10 |
| 3 | اضافة العزلة (T. N2) + الممرض | 0.77 | 20 | 3 | 17 |
| 4 | اضافة العزلة (T. B6) + الممرض | 1 | 22 | 2.5 | 19.5 |
| 5 | اضافة العزلة (T. H9) + الممرض | 1.07 | 25 | 3 | 22 |
| 6 | اضافة العزلة (T. N2) + (T. B6) + الممرض . | 0.9 | 24 | 3.5 | 20.5 |
| 7 | اضافة العزلة (T. N2) + (T. H9) + الممرض | 1.04 | 26 | 4 | 22 |
| 8 | اضافة العزلة (T. H9) + (T. B6) + الممرض | 1.4 | 28 | 3 | 25 |
| 9 | اضافة العزلة (T. H9) + (T. B6) +(T.N2)+ الممرض | 1 | 27 | 4 | 23 |
| | L.S.D (0.05) | 0.199 | 2.050 | 1.353 | 1.956 |

*كل رقم في الجدول يمثل ثلاث مكررات

وفي دراسة سابقة بينت أن معاملة تربه الطماطه بالفطر *T.viride* أدى إلى زيادة في نمو النبات بشكل معنوي (قاسم وآخرون ،1987) وكذلك وجد أنَّ بعض عزلات *T.harzianum* تعمل على اختزال المدة الزمنية لانبات نسبة انبات البذور في النارنج .وأطلق Barker 1986 عليها مصطلح محفزات النمو phytostimalater .وذكر chang وآخرون (1986) أن التبكير في الانبات في بذور الفلفل وزهرة الاقحوان و زيادة الطول والوزن الجاف لكليهما يعود إلى إفراز مواد شبيه بمنظمات النمو ناتج عن المعاملة بعالق ابواغ الفطر. *harzianum* Tو زيادة في عدد وحدات الكالس في قاعدة العقد ،نسبه التحذير للعقل . وذكر محمد (2020) اضافة العامل الاحيائي *T .harzianum* اثرت وبشكل معنوي على طول ووزن الرطب والجاف وطول الرويشة ونسبة الانيات لبادرات الحنطة .ووجد علي (2010) اضافة الفطر *T . harzianum* الى التربة المزروعة بنبات الذرة البيضاء ادى الى زيادة في ارتفاع النبات وعدد اوراق النبات .كما وجد Khalaf واخرون (2016) ان اضافة العامل *T .harzianum* لتربة المزروعة الذرة الصفراء ادى الى زيادة معنوية في ارتفاع النبات والمساحة الورقية والوزن الجاف لنبات الذرة .وبين علوان (2005) أنَّ اضافة المستحضر الحيوي للفطر *T.harzianum* وفر حماية كاملة لبادرات الحنطة ضد الفطرين *P.aphanidermatum* و *R.solani* وكذلك أدى الى زيادة كبيرة في مؤشرات النمو والانتاج والمتضمنة عدد الاشطاء وعدد السنابل ووزن البذور وبالتالي زيادة كبيرة في

الانتاجية تصل الى 250 % وزيادة الوزن الجاف للمجموعين الجذري والخضري. وفي دراسة اخرى ذكر السرحاني واخرون (2017) أنَّ اضافة الفطر *T.harzianum* الى التربة ادى الى زيادة معنوية في جميع الصفات المدروسة (نسبة الأنَّبات ،طول البادرات ،الوزن الرطب والجاف ،وفي دراسة اخرى ادت الى زيادة طول البادرات والكتلة الحيوية (Vessey،2003 Adeleke،2010) كما وجد أنَّ اضافة الفطر *T.harzianum* للتربة سبب زيادة معنوية في انبات بذور الفجل (Hoffland واخرون،2004) ووجد أنَّ استعمال المستحضر الفطر *T.harzianum* النامي على وسط نخالة الحنطة احدث زيادة معنوية في نمو نبات الباقلاء (Elad،1980) كما وجد أنَّ معاملة بذور الطماطة بالفطر *T.harzianum* اظهر زيادة معنوية في النمو والحاصل الكلي (Datnoff و Pernezy، 2000).

## 5- الاستنتاجات والتوصيات

### 5-1 الاستنتاجات

1- اظهرت معظم العزلات الفطرية للفطر *Trichoderma* spp قدرة تثبيط عالية ضد المسببات المرضية النباتية المعزولة من نباتات الباميا المصابة .

2- تبين من خلال التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري *Trichodermin* ومنظمات النمو $GA_3$ وIAA قدرة جميع عزلات الفطر *Trichoderma* spp المختبرة على انتاج السم الفطري ومنظمات النمو وبتراكيز مختلفة.

3- أنَّ الرواشح عزلات الفطر Trichoderma spp ذات قدرة تثبيط عالية ضد المسببات المرضية .

4- تبين من خلال اختبار التداخل بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp عدم وجود تضاد بين بعض العزلات وبهذا امكن استخدامها بشكل توليفة ضد مسببات الامراض النباتية.

5- أنَّ الرواشح عزلات الفطر *Trichoderma* spp ذات قدرة تثبيط عالية ضد المسببات المرضية .

6- أنَّ اضافة المستحضر الحيوي لبعض عزلات الفطر *Trichoderma* spp وتوليفاتها كانت ذات تأثيراً معنوي على نسبة الانبات وموت البادرات على نبات الباميا في الاصص البلاستيكية واثرت ايضاً بشكل معنوي على الوزن الطري وطول المجموع الخضري الجذري .

**2-5 التوصيات**

1- التوسع في عزل وتشخيص انواع الفطر *Trichoderma* spp محلياُ بسبب امتلاكها القدرة العالية على تثبيط المسببات المرضية بالإضافة الى تعزيز نمو النبات .

2- التوسع في دراسة تأثير رواشح الفطر*Trichoderma* spp التي تحتوي على مركبات أيض ثانوي متنوعة وذات اهمية في تثبيط المسببات المرضية ودراسة تأثيرها على نمو المسببات المرضية و زيادة نمو النبات .

3- البحث عن اوساط زرعيه أخرى محفزة لإنتاج مركبات الايض الثانوي والاحتفاظ بحيوية الفطر لمدة زمنية اطول .

4- انتاج مستحضرات الفطر *Trichoderma* spp بتوليفاتها في معاملة التربة من اجل مقاومة المسببات الممرضة الكامنة في التربة وتحسين نمو النبات .

## 6- المصادر

### 6-1 المصادر العربية


- **احمد ، علاء ناصر، نجلاء حسين محمد وعبد الصمد عبود عبدالله (2019)** تقييم كفاءة الفطر الاحيائي *Trichoderma harzianum* وبعض المستخلصات النباتية في مقاوم الفطر *Alternaria alternate* المسبب لتبقع اوراق النخيل . مجلة البصرة لابحاث نخلة التمر المجلد (18 )العدد (2).

- **آدم ، كمال ابراهيم (2000) .** المقاومة المتكاملة لتعفن جذور وسقوط بادرات الطماطة ، اطروحة دكتوراه – كلية الزراعه والغابات – جامعة الموصل.

- **الاسدي ، علي عبد علي عودة (2020) .** استخدام بعض العوامل الاحيائية و الجسيمات النانوية والتراكيب الوراثية في مقاومة بعض مسببات امراض تعفن بذور و موت بادرات الطماطة (*Solanum lycopersicom* L) . رسالة الماجستير – كلية الزراعة – جامعه كربلاء.

- **ألخفاجي، محمد نعيثل راضي (2010).** دراسة لمرض تعفن جذور الباميا *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench المتسبب عن الفطر *Macrophomina phaseolina* وعلاقته بديدان العقد الجذرية ومكافحته المتكاملة . رسالة ماجستير. كلية الزراعة . جامعة البصرة .

- **بدن ، محمد محسن ، (1996).** تأثير بعض المبيدات على فطريات التربة غير المستهدفة. رسالة ماجستير. كلية الزراعة – جامعة البصرة

- **جابر، محمد حسن (2020).** عزل وتشخيص الفطريات المسببة لمرض تعفن وموت بادرات الحنطة *Triticum aestivum* في محافظة كربلاء ومكافحتها باستخدام التكامل بين الاصناف والمركبات النانوية والعامل الاحيائي *Trichoderma harzianum* . رسالة ماجستير –كلية الزراعة – جامعة كربلاء .

- **جبارة ، افتخار موسى (2002) .** أثر البسترة الشمسية في بقاء مبيدي المقاومة الاحيائية تحدي *Trichoderma harzianum* وصمود *Paecilomyces lilacinus* في مكافحة بعض امراض الجذور في الزراعة المحمية. رسالة ماجستير. كلية الزراعة – جامعة بغداد.

- **حافظ ، حمدية زاير علي (2001) .** المكافحة المتكاملة لمرض التعفن الفحمي على السمسم المتسبب عن الفطر *Macrophomina phaseolin* رسالة ماجستير- كلية الزراعة - جامعة بغداد .

- **حسون ، ابراهيم خليل ، عهد عبد علي و عبد علي عبيد (2009).** تقييم كفاءة الفطر الاحيائي ومساحيق بعض النباتات في مكافحة الفطر المسبب لمرض تقرح والقشرة السوداء على البطاطا تحت ظروف الضلة الخشبية .مجلة جامعة بابل –العلوم الصرفة التطبيقية – المجلد (17) العدد (1).

- **حمد ، عبد الغني عبد العزيز (2002).** مكافحة مرض العفن الابيض على المجموع الخضري للباذنحان بواسطة الفطر *Trichoderma harzianum* ، إطروحة دكتوراه -كلية الزراعة -جامعة بغداد .

- **حمودي ، عبد الحميد محمد (1999).** تشخيص الفطريات المتواجدة في جذور الحنطة وتأثيرها على الفطرين الممرضين *Fusarium graminearum* Schwabe و *Rhizoctonia solani* Kuhn . إطروحة دكتوراه - كلية التربية - جامعة البصرة .

- **حميد ، فاخر رحيم (2002)** . دراسة كفاءة عزلات من الفطر *Trichoderma spp*. في استحثاث المقاومة ضد الفطر *Rhizactonia solani* في اربعة اصناف من القطن. رسالة ماجستير - كلية الزراعة - جامعة بغداد .

- **راضي، كفاح هادي(2018).** المكافحة الاحيائية للفطر *Fusarium solani* مسبب مرض تعفن جذور الباميا. اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة. جامعة بغداد.

- **سعد ، نجاة عدنان (2001).** التداخل بين ديدان العقد الجذرية Meloidogyne javanica والفطر Rhizoctonia solani في الباذنجان ومقاومته احيائياً. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد.

- **سعيد ، فالح حسن ،هادي مهدي عبود وكاظم ديلي حسن (2014)** . الكشف عن هرموني الأوكسين والسايتوكانين في راشح نمو بعض المخصبات الأحيائية . المؤتمر العلمي الوطني النسوي الثاني ( 188-192 ).

- **الشعبي ، صلاح ، جورج ملوحي و لينا مطرود (2007) .** مكافحة مرض سقوط البادرات الطماطة (*Rhizoctonia solnai* Kuhn ) بـأستخدام الفطر *Trichoderma koningii* Oudem والمبيدين فلوتولانيل و تولكلوفوس مثيل .مجلة وقاية النبات العربية .25 :15 - 27

- **شمران ، زيد طالب ( 2017 ) .** تقييم فعالية بعض العوامل الاحيائية ومستحضر الاحياء المجهرية EM – 1 ضد الفطر *Macrophomina phaseolina* مسبب مرض التعفن الفحمي على نبات زهرة الشمس . رسالة ماجستير ، الكلية التقنية / المسيب – جامعة الفرات الوسط التقنية .

- **صالح ، يحيى عاشور ومحمد محسن بدن (1999).** المقاومة الكيميادية والحياتية للفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لموت البادرات في الطماطة ، البصرة للعلوم الزراعية. المجلد (1) 12 : 14-3.

- **طه ، خالد حسن. (1990)** . المقاومة المتكاملة لمرض ذبول الخضروات الوعائي المسبب عن الفطر *Verticillium dahliae* اطروحة دكتوراه - كلية الزراعة – جامعة بغداد .

- **طه، خالد حسن، خالدة عبد الجواد و وليد عبد الجبار عثمان (1987) .** تشخيص الفطريات المسببة لموت بادرات اليوكالبتوس في محافظة نينوى ومقاومتها كيميائياً وحيويا . مجلة العلوم الزراعية العراقية 5: 225-232

- **عباس ، محمد حمزة (1998).** دراسة مرض تعفن بذور وموت بادرات الحنطة المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* في منطقة البصرة. رسالة ماجستير- كلية الزراعة – جامعة البصرة.

- **عبدالله ، زينب خلف (2005).** دراسة لبعض انواع الجنس *Alternaria* spp وقابليتها المثبطة لبعض الفطريات . رساله ماجستير- كليه التربية - جامعة البصرة .

- **عبود ، مؤيد رجب ، هادي مهدي عبود و فالح حسن سعيد ( 2008 ) .**كفاءة عزلات من الفطر *Trichoderma* spp . في تحفيز إنبات بذور ونمو شتلات النارنج مجلة العلوم الزراعية العراقية ، 39 ( 2 ) : 19- 25

- **علوان ، صباح لطيف (1996).** السيطرة الحيوية للفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لذبول الحنطة باستخدام عزلة غير ممرضية للفطر *Rhizoctonia solani* والفطر *Trichoderma harzianum*. مجلة البصرة للعلوم الزراعية ، المجلد (2).

- **علوان ، صباح لطيف (2005).**امكانية تصنيع مبيد احيائي من *الفطر Trichoderma harzianium* لمكافحة مرض تعفن البذور وموت البادرات .اطروحة دكتوراه - كلية التربية – جامعه الكوفة

- **علي ، عبد الزهرة جبار(2010) .** تأثير الفطر *Trichoderma harzianum* في بعض معايير النمو والإنتاجية لصنفي الذرة البيضاء *Sorghum bicolor* L.أنقاذ وكافير 2 تحت الظروف الحقلية. مجلة أوروك للأبحاث العلمية. (3):76-91.

- **قاسم ، نبيل عزيز و خالد حسن طه نضال يونس محمد (1987).** المكافحة الحيوية لمرض موت بادرات الطماطه . المجلة العراقية للعلوم 5 :213 -211 .

- **كريم ، فاطمة هادي (2012).** عزل وتشخيص المسببات الفطرية لتعفن جذور الباميا والتكامل في مقاومتها بمحافظة بابل .رسالة ماجستير.هيئة التعليم التقني-الكلية التقنية/المسيب.137 ص.

- **المالكي ، بشرى صبير عبد السادة. (2002).** تأثير المخلفات الحيونية والمقاومة الاحيائية الفطر *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitz المسبب لمرض تعفن بذور وموت بادرات الخيار . رسالة ماجستير- كلية الزراعة - جامعة بغداد

- **نهال يونس محمد ال مراد (2011 ) .** قدرة بعض عزلات الفطر *Trichoderma* spp على انتاج انزيم السيليوليز و دورة في استحثاث المقاومة للفطر *Macrophomin phaseolina* . مجلة علوم الرافدين،22: 46 -59.

- **وناس ، رسل علي (2012) .** عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لجذور نبات اللوبيا *Vigna unguiculata* L. والتكامل في مقاومتها. رسالة ماجستير. كلية الزراعة-جامعة الكوفة.

## 6-2: References

**Aboud, H. M.; Said , S. A. ; Saleh, H. N. and Dewan , M. M. (2001)**. Studies for isolate of *Thielavopsis paradoxa.* The Scientific Journal of Iraq Atomic Energy Commission. 3: 150-155.

- **Adeleke**, **A. B. (2010)**. Effect of Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on glomalin production (Doctoral dissertation). microorganisms in sustainable agriculture – A review. Agron. Sustain.Dev. 27: 29-43
- **Afzal,S.,S.Tariq,V.Sultana,J.Ara and S. Ehteshamul–Haque. (2013)**. Managing the Root diseases of Okra with endo – root plant Growth promoting *Pseudomonas* and *Trichoderma viride* associated with healthy 0kra Roots . Pak.J. Bot 45:1455-1460
- **Agrios , G. N. (2005)**. Plant Pathology . 5th Ed. Elsevier Inc. USA. 998pp.
- **Aguiar, F.M.,S. J.Michereff,L. S.B0iteux and A. Reis. (2013).**Search for sources Of resistance to Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum f. sp*. *vasinfectum*) in Okra germplasm. Crop Breeding Applied Biotechnology 13:33-40.
- **Ahmadi ,Z. , Saifullah ,F. Raziq , H. Khan and M. Idrees (2012).** Chemical and Biological control of *Fusarium* root rot Okra. Pak .J B0t.44:453-457
- **Ahmed, S. N. A., Heidi, I. G. A., Allam, A. D., & Hassan, M. H. A. (2013).** Effect of Trichoderma harzianum as biocontrol agent on wheat damping-off disease. Assiut Journal of Agricultural Sciences, 44(1), 20-37.
- **Al – Hazmi , A. and M. T.Javeed . (2016).** Effects of different inoculum densities of Trichoderma harzianum and Trichoderma viride against

Meloidogyne javanica on tomato Saudi Journal of Biological Sciences 23 288-292

- **Al-Ani, L. K. T. (2018).** Trichoderma: beneficial role in sustainable agriculture by plant disease management. In Plant microbiome: Stress response (pp. 105-126). Springer, Singapore.
- **Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. (1996)**. Introductory mycology (No. Ed. 4). John Wiley and Sons.
- **Al-Hamdany, M. A. (1988).** Efficiency of isolates Trichoderma spp. to suppress Rhizoctonia solani in sesame, J. Agric. Water Res. 7(2):107 – 114.
- **Ali,R.,H. Khan , F. Ahmad and N. Ahmad . (2013).** colony colour and texture of different isolated of *Fusarium solani* ,the cause of root rot Diseases of Okra (*Abelmoschus esculentus* L ) in peshawar .Asia J Agri Biol , 1 :190-193.
- **Almassi, F., Ghisalberti, E. L., Narbey, M. J., & Sivasithamparam, K. (1991).** New antibiotics from strains of Trichoderma harzianum. Journal of Natural Products, 54(2), 396-402.
- **AL-Surhanee, A. A., ALmashari, R. M., & ALkhluif, S. H. A. (2017).** The effect of trichoderma harizanum fungus usage as bio-fertilizer on tomato seedling growth. The Iraqi Journal of Agricultural Science, 48(4), 1115.
- **Al-Tamimi, F. M. S. (2005).** Effect ofInteractions between Biocides and Chemicaland Biological Fertilizers on Wheat Plant. PhD thesis. Agricultural mechanism. BaghdadUniversity. (inArabic)
- **Altindag, M., Sahin, M., Esitken, A., Ercisli, S., Guleryuz, M., Donmez, M. F., & Sahin, F. (2006).** Biological control of brown rot (Moniliana laxa Ehr.) on apricot (Prunus armeniaca L. cv. Hacıhaliloğlu)

by Bacillus, Burkholdria, and Pseudomonas application under in vitro and in vivo conditions. Biological Control, 38(3), 369-372.

- **Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T. H. O. M. A. S., & Harman, G. E. (1999).** Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus Trichoderma harzianum Rifai 1295-22. Applied and environmental microbiology, 65(7), 2926-2933.
- **Arora, N. K., Kang, S. C., & Maheshwari, D. K. (2001).** Isolation of siderophore-producing strains of Rhizobium meliloti and their biocontrol potential against Macrophomina phaseolina that causes charcoal rot of groundnut. Current Science, 673-677.
- **Atanasova, L., Le Crom, S., Gruber, S., Coulpier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2013).** Comparative transcriptomics reveals different strategies of Trichoderma mycoparasitism. BMC genomics, 14(1), 1-15.
- **Avinash, M., Nagaraju, K., Muthuraju, R., Asha, N. N., & Krishna Murthy, R. (2019).** Pigeon pea Fusarium wilt: In vitro pathogenicity test of Fusarium isolates and its biological control. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *8*(6), 1600-1604..
- **Azarmi, R., Hajieghrari, B., & Giglou, A. (2011**). Effect of Trichoderma isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. African Journal of Biotechnology, 10(31), 5850-5855.
- **Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J., ... & Holmes, K. A. (2008).** Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic Trichoderma isolates with biological control potential in Theobroma cacao. Biological control, 46(1), 24-35.

- **Baker, K. F., and Cook, R. J. (1974).** Biological control of plant pathogens. WH Freeman and Company..
- **Baker, R. (1989)**. Improved Trichoderma spp. for promoting crop productivity. Trends in Biotechnology, 7(2), 34-38.
- **Baker, S. E., Perrone, G., Richardson, N. M., Gallo, A., & Kubicek, C. P. (2012).** Phylogenomic analysis of polyketide synthase-encoding genes in Trichoderma. Microbiology, 158(1), 147-154.
- **Bandelier, S., Renaud, R., & Durand, A. (1997)**. Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. Process Biochemistry, 32(2), 141-145.
- **Benchasri, S.(2012)**. Okra (*Abelmoshus esculentus* L. Monech) as valuable vegetable of the word Ratar port, 49 :105-112.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codon, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. International microbiology, 7(4), 249-260.
- Benson, D. A. I, Karsch-Mizrachi, DJ Lipman, J. Ostell, and DL Wheeler. 2005.“GenBank.”. Nucleic Acids Research, 33.
- **Berríos, J., Illanes, A., & Aroca, G. (2004).** Spectrophotometric method for determining gibberellic acid in fermentation broths. Biotechnology letters, 26(1), 67-70.
- **Bisen, K., Keswani, C., Patel, J. S., Sarma, B. K., & 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.
- **Bissett, J. (1991).** A revision of the genus Trichoderma. II. Infrageneric classification. Canadian journal of botany, 69(11), 2357-2372.

- **Blanchard, L. M., & Björkman, T. (1996).** The Role of Auxin in Enhanced Root Growth of Trichodermacolonized Sweet Corn. HortScience, 31(4), 688c-688.
- **Błaszczyk, L., Basińska-Barczak, A., Ćwiek-Kupczyńska, H., Gromadzka, K., Popiel, D., & Stępień, Ł. (2017).** Suppressive Effect of Trichoderma spp. on toxigenic Fusarium species. Polish journal of microbiology, 66(1).
- **Błaszczyk, L., Popiel, D., Chełkowski, J., Koczyk, G., Samuels, G. J., Sobieralski, K., & Siwulski, M. (2011).**Species diversity of Trichoderma in Poland. Journal of applied genetics, 52(2), 233-243.
- **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.
- **Chang, Y. C., Chang, Y. C., Baker, R., Kleifeld, O., & Chet, I. (1986).** Increased growth of plants in the presence of the biological control agent Trichoderma harzianum. Plant disease, 70(2), 145-148.
- **Chaube, H. S., & Pundhir, V. S. (2005).** Crop diseases and their management. PHI Learning Pvt. Ltd..
- **Chaverri, P., Gazis, R. O., & Samuels, G. J. (2011)**. Trichoderma amazonicum, a new endophytic species on Hevea brasiliensis and H. guianensis from the Amazon basin. Mycologia, 103(1), 139-151.
- **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
- **Chu, K. H., Li, C. P., & Qi, J. (2006).** Ribosomal RNA as molecular barcodes: a simple correlation analysis without sequence alignment. Bioinformatics, 22(14), 1690-1701.

- **Cole, R. J., and Cox, R. H. (1981).**Handbook of Toxic Fungal Metabolites I. NewYork, NY: Academic Press.
- **Conrad, C. C., Gilroyed, B. H., McAllister, T. A., & Reuter, T. (2012).** Synthesis of O-serogroup specific positive controls and real-time PCR standards for nine clinically relevant non-O157 STECs. Journal of microbiological methods, 91(1), 52-56.
- **Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Del-Val, E. K., & Larsen, J. (2016).** Ecological functions of Trichoderma spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. FEMS microbiology ecology, 92(4), fiw036.
- **Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983).** The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society..
- **Corley, D.G., Miller-Wideman, M., Durley, R.C., (1994)**. Isolation And structure of harzianum A: a new trichothecene from *Trichoderma harzianum*. J. Nat. Prod. 57, 422–425.
- **Cutler, H. G., Cutler, S. J., Ross, S. A., Sayed, K. E., Dugan, F. M., Bartlett, M. G., ... & Parker, S. R. (1999).** Koninginin G, a new metabolite from Trichoderma aureoviride. Journal of Natural Products, 62(1), 137-139.
- **Cutler, H. G., Himmelsbach, D. S., Arrendale, R. F., Cole, P. D., & Cox, R. H. (1989).** Koninginin A: a novel plant growth regulator from Trichoderma koningii. Agricultural and Biological Chemistry, 53(10), 2605-2611.
- **Daoubi, M., Pinedo-Rivilla, C., Rubio, M. B., Hermosa, R., Monte, E., Aleu, J., & Collado, I. G. (2009).** Hemisynthesis and absolute configuration of novel 6-pentyl-2H-pyran-2-one derivatives from Trichoderma spp. Tetrahedron, 65(25), 4834-4840.

- **Datnoff, L. E., & Pernezny, K. L. (1998).** Effect of bacterial and fungal microorganisms to colonize tomato roots, improve transplant growth and control of Fusarium crown and root rot. Florida Tomato Institute Proceedings, 111, 26-33.
- **Degenkolb, T., Dieckmann, R., Nielsen, K. F., Gräfenhan, T., Theis, C., Zafari, D., ... & Samuels, G. J. (2008).** The Trichoderma brevicompactum clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. Mycological Progress, 7(3), 177-219.
- **Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012).** A historical overview of natural products in drug discovery. Metabolites, 2(2), 303-336.
- **DOLEY, K., & JITE, P. K. (2012).** In-vitro efficacy of Trichoderma viride against Sclerotium rolfsii and Macrophomina phaseolina. Notulae Scientia Biologicae, 4(4), 39-44.
- **Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Kubicek CP (2006).** The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. Mycoscience 47:55–64
- **Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., ... & Kubicek, C. P. (2011).** Trichoderma: the genomics of opportunistic success. Nature Reviews Microbiology, 9(10), 749-759.
- **Dunlop, R. W., Simon, A., Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E. L. (1989).** An antibiotic from Trichoderma koningii active against soilborne plant pathogens. Journal of Natural Products, 52(1), 67-74.
- Ehteshamul-Haque, S., Hashmi, R. Y., & Ghaffar, A. (1992). Biological control of root rot disease of lentil. Lens, 19(2), 43-45.
- **Elad, Y.; Chet, I. and Katan, J. (1980).** Trichoderma harzianum: Abiocontrol Agent Effective sclerotium rolfsii and Rhizoctonia Solani. Phytopathology. 70: 119 – 121

- **Ellis, M.B.(1976).** More dematiaceous hyphomycetes.Common wealth Agricultural Bureau, Kew,England
- **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 Americ
- **Fan, F., Hamada, M. S., Li, N., Li, G. Q., & Luo, C. X. (2017).** Multiple fungicide resistance in Botrytis cinerea from greenhouse strawberries in Hubei Province, China. Plant disease, 101(4), 601-606.
- **Fravel, D. R., Connick, W. J., & Lewis, J. A. (1998).** Formulation of microorganisms to control plant diseases. In Formulation of microbial biopesticides (pp. 187-202). Springer, Dordrecht.
- **Gajera, H., Domadiya, R., Patel, S., Kapopara, M., & Golakiya, B. (2013).** Molecular mechanism of Trichoderma as bio-control agents against phytopathogen system–a review. Curr. Res. Microbiol. Biotechnol, 1, 133-142.
- **Gal-Hemed, I., Atanasova, L., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I. S., Viterbo, A., & Yarden, O. (2011).** Marine isolates of Trichoderma spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. Applied and Environmental Microbiology, 77(15), 5100-5109.
- **Garcia, C. C., Rosso, M. L., Bertoni, M. D., Maier, M. S., & Damonte, E. B. (2002).** Evaluation of the antiviral activity against Junin virus of macrocyclic trichothecenes produced by the hypocrealean epibiont of Baccharis coridifolia. Planta medica, 68(03), 209-212.
- **Garrett, S.D. (1970).** Pathogenic root – infecting fungi . Cambrodge Univ. Press, Cambridge . England . 294 pp.

- **Ghisalberti, E. L., & Rowland, C. Y. (1993).** Antifungal metabolites from Trichoderma harzianum. Journal of Natural Products, 56(10), 1799-1804.
- **Godtfredsen, W. O., & Vangedal, S. (1964).** Trichodermin new antibiotic related to trichothecin. PROCEEDINGS OF THE CHEMICAL SOCIETY OF LONDON, (JUN), 188.
- **Godtfredsen, W. O., & Vangedal, S. (1965).** Trichodermin, a new sesquiterpene antibiotic. Acta chemica scandinavica, 19(5), 1088-1102.
- **Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951).** Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant physiology, 26(1), 192.
- **Gruber, S., Kubicek, C. P., & Seidl-Seiboth, V. (2011).** Differential regulation of orthologous chitinase genes in mycoparasitic Trichoderma species. Applied and environmental microbiology, 77(20), 7217-7226.
- **Hadar, Y., Harman, G. E., & Taylor, A. G. (1984).** Evaluation of Trichoderma koningii and T. harzianum from New York soils for biological control of seed rot caused by Pythium spp. Phytopathology, 74(1), 106-110.
- **Harman, G. E. (1991).** Seed treatments for biological control of plant disease. Crop protection, 10(3), 166-171.
- **Harman, G. E. (2000).** Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on Trichoderma harzinum T-22. Plant disease, 84(4), 377-393.
- **Harman, G. E. (2006).** Overview of mechanisms and uses of Trichoderma spp. Phytopathology, 96(2), 190-194.
- **Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004).** *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature reviews microbiology, 2(1), 43-56.

- **Harman,G.E.(2011).** *Trichoderma* not just for biocontrol anymore. Phytoparasitica.;39:103-108.
- **Harun W, Razak F. (2013).** Antifungal susceptibility and growth inhibitory response of oral Candida species to Brucea javanica Linn. extract. BMC Complement Altern Med;13(1):1–8.
- **Hasan, H. A. H. (2002).** Gibberellin and auxin-indole production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. Acta microbiologica et immunologica Hungarica, 49(1), 105-118.
- **Hassan Taha, K. (2010).** New Biotype OF *Trichoderma* spp EFFECTIVE IN Production Of Some Plant Growth Regulators. Mesopotamia Journal of Agriculture, 38, 75-82.
- **Hoffland, E. T.; W. Kuyper; H. Wallaner; C. Plassard, A. AGorbushina; K. Haselwandter,; S. Holm strom; R. landeweert; U. S. Lundstorm; A. Rosling;R. Sen; M. M. Smith; P. A. VanHees, & V. Anbreemen,. (2004).** The Role of Fungi in weathering. Front Ecol. Environ 2(5):258-269
- **Holbrook, A. A., Edge, W. J. W., & Bailey, F.(1961).** Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid.
- **Inoue, I.; Namiki, F. & Tsuge, T. (2002).** Plant colonization by vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* requires FOW1, ageneencoding amitochondrial protein .The Plant Cell, American Societyof Plant Biologists 14:1869-1883.


**Inoue, I.; Namiki, F. and Tsuge, T. (2002).** Plant colonization by vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* requires FOW1, ageneencoding amitochondrial protein .The Plant Cell, American Societyof Plant Biologists 14:1869-1883.

- **Iqbal, S. M., Bakhsh, A., Hussain, S., & Malik, B. A. (1995).** Microbial antagonism against Sclerotium rolfsii, the cause of collar rot of lentil. Lens-Newsletter, 22, 48-49.
- **Issa, J. A., & Jabbar, A. S. (2019).** Effect of infestation cotton seed bug Oxycarenus hyalinipennis Costa (*Oxycarenidae Hemiptera*) on the weight and percentage of seeds germination of some Okra varieties and seeds content of protein and oil in the field. Jornal of Al-Muthanna for Agricultural Sciences, 7(3), 222-229.
- **Iwen, P. C., Hinrichs, S. H., & Rupp, M. E. (2002).** Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. Medical mycology, 40(1), 87-109.
- **Jackson, C. E. (1958).** Hereditary hyperparathyroidism associated with recurrent pancreatitis. Annals of internal medicine, 49(4), 829-836.
- **Jacobsen, B.J.(2006).**Biological control of plant diseases by phyllosphere applied biological control agents. Microbial ecology of aerial plant surfaces, 133-147.
- **Jin, H. Z., Lee, J. H., Zhang, W. D., Lee, H. B., Hong, Y. S., Kim, Y. H., & Lee, J. J. (2007).** Harzianums A and B produced by a fungal strain, Hypocrea sp. F000527, and their cytotoxicity against tumor cell lines. Journal of Asian natural products research, 9(3), 203-207.
- **Jin-lian, C. H. E. N., Kai, L. I. U., Cui-ping, M. I. A. O., Hui-lin, G. U. A. N., Li-xing, Z. H. A. O., & Shi-zhong, S. U. N. (2015).** Chemical constituents with siderophores activities from Trichoderma koningiopsis YIM PH30002. NATURAL PRODUCT RESEARCH AND DEVELOPMENT, 27(11), 1878.
- **John, R. P., Tyagi, R. D., Prévost, D., Brar, S. K., Pouleur, S., & Surampalli, R. Y. (2010).** Mycoparasitic Trichoderma viride as a biocontrol agent against Fusarium oxysporum f. sp. adzuki and Pythium

arrhenomanes and as a growth promoter of soybean. Crop protection, 29(12), 1452-1459.

- **Jones, K. A., & Burges, H. D. (1998).** Technology of formulation and application. In Formulation of microbial biopesticides (pp. 7-30). Springer, Dordrecht.
- **Joshi, S. M., De Britto, S., Jogaiah, S., & Ito, S. I. (2019).** Mycogenic selenium nanoparticles as potential new generation broad spectrum antifungal molecules. Biomolecules, 9(9), 419.Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. Food and energy security, 6(2), 48-60.
- **Juntarawijit, C., & Juntarawijit, Y. (2018).** Association between diabetes and pesticides: a case-control study among Thai farmers. Environmental health and preventive medicine, 23(1), 1-10.
- **Kachroo, A., & Robin, G. P. (2013).** Systemic signaling during plant defense. Current Opinion in Plant Biology, 16(4), 527-533.
- **Kacprzak, M. J.; Rosikon, K.; Fijalkowski,K. and Grobelak, A. (2014).** The Effect of Trichoderma on Heavy Metal Mobility and Uptakeby Miscanthusgiganteus, Salix sp.,Phalarisarundinacea, and Panicum virgatum.Applied and Environmental Soil Science,2014: 10 p
- **Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B. K., Singh, S. P., & Singh, H. B. (2014).** Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various Trichoderma spp. Applied microbiology and biotechnology, 98(2), 533-544.
- **Khalefah, K. M., & Hamada, A. A. (2019).** The Effect of Interaction Between Mycorrhiza (G. mosseae), Trichoderma (T. harzianum) and Phosphate Fertilization on Growth of Maize. Tikrit Journal for Agricultural Sciences .98-90 ،(4)16

- **Khan, M.S., A. Zaidi and P.A. Wani, (2007).** Role of phosphate-solubilizing
- **Khan, R. A. A., Najeeb, S., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Li, Y., & Xie, B. (2020).** Bioactive secondary metabolites from Trichoderma spp. against phytopathogenic bacteria and Root-knot nematode. Microorganisms, 8(3), 401.
- **Khan, S. N. (2007).** Macrophomina phaseolina as causal agent for charcoal rot of sunflower. Mycopath, 5(2), 111-118.
- **Kilonzi, J. M., Mafurah, J. J., & 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 CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, et al (201l).** Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of Trichoderma. Genome Biol.;12:R40
- **Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2002).** Phylogeny and evolution of the genus Trichoderma: a multigene approach. Mycological Research, 106(7), 757-767.
- **Landreau, A. (2001).** Metabolites d'une souche de trichoderma koningii oudemans isolee du milieu marin: etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture (doctorat chimie biologie) (Doctoral dissertation, Nantes).
- **Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006) .**Fusarium laboratory workshops—a recent history. Mycotoxin Research, 22(2), 73-74.

- **Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E., & Monte, E. (2010).** Translational research on Trichoderma: from'omics to the field. Annual review of phytopathology, 48, 395-417.
- **Lozovaya, V. V.; Lygin, O. V.; Zernova, S.; Li, J.; wind Holm, M. and Hartman , G. L. (2006).** Lignin degradation by *Fusarium solani* plant Dis. 9. 77 – 82.
- **Ma, Z., Ge, L., Lee, A. S., Yong, J. W. H., Tan, S. N., & Ong, E. S. (2008).** Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (Cocos nucifera L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. Analytica Chimica Acta, 610(2), 274-281.
- **Mahde, B. Y., Fayyadh, M. A., & 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.
- **María Fernanda Gonzalez, Freddy Magdama, Luis Galarza, Daynet Sosa & Christian Romero (2020).** Evaluation of the sensitivity and synergistic effect of Trichoderma reesei and mancozeb to inhibit under in vitro conditions the growth of Fusarium oxysporum, Communicative & Integrative Biology, 13:1, 160-169,
- **Meshu, S., Ingle, S. T., Mane, S. S., Giri, G. K., & Shinde, P. B. (2019).** Morphological and molecular variation among the isolates of Trichoderma longibrachiatum by using RAPD markers. Journal of Mycopathological Research, 57(2), 113-116.
- **Miethke, M. (2013).** Molecular strategies of microbial iron assimilation: from high-affinity complexes to cofactor assembly systems. Metallomics, 5(1), 15-28.

- **Mihail, J.D. (1989).***Macrophomina phaseolina*: Spatio-Temporal dynamics of inoculum and of disease in a highly susceptible crop. Phytopathology, 79: 848-855.
- **Ming, Q., Han, T., Li, W., Zhang, Q., Zhang, H., Zheng, C., ... & Qin, L. (2012).** Tanshinone IIA and tanshinone I production by Trichoderma atroviride D16, an endophytic fungus in Salvia miltiorrhiza. Phytomedicine, 19(3-4), 330-333.
- **Mohamed, B. F., Sallam, N. M., Alamri, S. A., Abo-Elyousr, K. A., Mostafa, Y. S., & Hashem, M. (2020).** Approving the biocontrol method of potato wilt caused by Ralstonia solanacearum (Smith) using Enterobacter cloacae PS14 and Trichoderma asperellum T34. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 30, 1-13.
- **Montealegre, J., Valderrama, L., Sánchez, S., Herrera, R., Besoain, X., & Pérez, L. M. (2010).** Biological control of Rhizoctonia solani in tomatoes with Trichoderma harzianum mutants. Electronic Journal of Biotechnology, 13(2), 1-2.
- **Mukerji, K.G; Garg, K.L( 1987).** Trichoderma as biocontrol agent. Biocontrol of plant diseases V.1, P.71-82.
- **Mukherjee, P. K., Buensanteai, N., Moran-Diez, M. E., Druzhinina, I. S., & Kenerley, C. M. (2012).** Functional analysis of non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) in Trichoderma virens reveals a polyketide synthase (PKS)/NRPS hybrid enzyme involved in the induced systemic resistance response in maize. Microbiology, 158(1), 155-165.
- **Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., & Kenerley, C. M. (2012).** Secondary metabolism in Trichoderma–a genomic perspective. Microbiology, 158(1), 35-45.
- **Mukherjee, P. K., Wiest, A., Ruiz, N., Keightley, A., Moran-Diez, M. E., McCluskey, K., ... & Kenerley, C. M. (2011).** Two classes of new

peptaibols are synthesized by a single non-ribosomal peptide synthetase of Trichoderma virens. Journal of Biological Chemistry, 286(6), 4544-4554.

- **Nagaraju, A., Sudisha, J., Murthy, S. M., & Ito, S. I. (2012).** Seed priming with Trichoderma harzianum isolates enhances plant growth and induces resistance against Plasmopara halstedii, an incitant of sunflower downy mildew disease. Australasian Plant *Pathology*, 41(6), 609-620.
- **Nakamura, A., Umemura, I., Gomi, K., Hasegawa, Y., Kitano, H., Sazuka, T., & Matsuoka, M. (2006).** Production and characterization of auxin- insensitive rice by overexpression of a mutagenized rice IAA protein. The Plant Journal, 46(2), 297-306.
- **Nielsen, K. F., Hansen, M. Ø., Larsen, T. O., & Thrane, U. (1998).** Production of trichothecene mycotoxins on water damaged gypsum boards in Danish buildings. International biodeterioration & biodegradation, 42(1), 1-7.
- **Osiewacz, H. D. (2002).** Sexual Development in Ascomycetes Fruit Body Formation of Aspergillus nidulans. In Molecular Biology of Fungal Development (pp. 212-238). CRC Press.
- Paningbatan, R. A. (1994). Trichoderma sp. for the Biocontrol of Sweet Pepper Stem Rot (Sclerotium rolfsii Sacc). Phil. Phytopatho., l, 30, 16-25.
- **Parker, S. R., Cutler, H. G., & Schreiner, P. R. (1995).** Koninginin E: isolation of a biologically active natural product from Trichoderma koningii. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 59(9), 1747-1749.
- **Pasura, A. (1993).** Production of Trichoderma harzianum biomass in submerged culture for biological control of plant pathogenic fungi.

- **Paulitz, T. C., Ahmad, J. S., & Baker, R. (1990).** Integration of Pythium nunn and Trichoderma harzianum isolate T-95 for the biological control of Pythium damping-off of cucumber. Plant and Soil, 121(2), 243-250.
- **Phoka, N., Suwannarach, N., Lumyong, S., Ito, S. I., Matsui, K., Arikit, S., & Sunpapao, A. (2020).** Role of volatiles from the endophytic fungus Trichoderma asperelloides PSU-P1 in biocontrol potential and in promoting the plant growth of Arabidopsis thaliana. Journal of Fungi, 6(4), 341.
- **Phuwiwat, W., Kaewkong, P., & Soytong, K. (2001).** Effects of Trichoderma harzianum Strain PC01 and Planting Media on Growth and Yield of Chinese Radish. Science & Technology Asia, 1-5.
- **Piel, C., Pouchieu, C., Carles, C., Beziat, B., Boulanger, M., Bureau, M., ... & Baldi, I. (2019).** Agricultural exposures to carbamate herbicides and fungicides and central nervous system tumour incidence in the cohort AGRICAN. Environment international, 130, 104876.
- **Rahim, S. and S. Dawar. (2015).**Seed borne mycoflora associated with Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) Pak . J.B0t.,47:747-751.
- **Ramírez-Cariño, H. F., Guadarrama-Mendoza, P. C., Sánchez-López, V., Cuervo-Parra, J. A., Ramírez-Reyes, T., Dunlap, C. A., & Valadez-Blanco, R. (2020).** Biocontrol of Alternaria alternata and Fusarium oxysporum by Trichoderma asperelloides and Bacillus paralicheniformis in tomato plants. Antonie van Leeuwenhoek, 113(9), 1247-1261.
- **Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernandez-Galan, R., & Collado, I. G. (2008).** Secondary metabolites from species of the biocontrol agent Trichoderma. Phytochemistry Reviews, 7(1), 89-123.

- **Rodrigues, C., Vandenberghe, L. P. D. S., Teodoro, J., Oss, J. F., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2009).** A new alternative to produce gibberellic acid by solid state fermentation. Brazilian Archives of Biology and Technology, 52, 181-188.
- **Romão-Dumaresq, A. S., de Araújo, W. L., Talbot, N. J., & Thornton, C. R. (2012).** RNA interference of endochitinases in the sugarcane endophyte Trichoderma virens 223 reduces its fitness as a biocontrol agent of pineapple disease.
- **Roquebert, M. F. (1996).** Intéractions antagonistes des Trichoderma sp. les systèmes telluriques: systématique biologie et écologie des organismes. Compterendu des, 4, 13-15.
- **Rotem, J.(1994).** The genus Alternaria, biology, epidemiology and pathogenicity. APS Press, St Paul, Minnesota, pp:1-325
- **Saba, H., Vibhash, D., Manisha, M., Prashant, K. S., Farhan, H., & Tauseef, A. (2012).** Trichoderma–a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. Mycosphere, 3(4), 524-531.
- **Sáenz-Mata, J., & Jiménez-Bremont, J. F. (2012).** HR4 gene is induced in the Arabidopsis-Trichoderma atroviride beneficial interaction. International journal of molecular sciences, 13(7), 9110-9128.
- **Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Van Oorschot, C. A. (1981).** Introduction to food-borne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures..
- **Samuels, G. J., Petrini, O., & Manguin, S. (1994).** Morphological and Macromolecular Characterization of *Hypocrea* schweinitzii and its *Trichoderma* anamorph. Mycologia, 86(3), 421-435.
- **Sanders, E. R., & Miller, J. H. (2010).** I, microbiologist: a discovery-based course in microbial ecology and molecular evolution. ASM press.

- **Santos, H. C., Pereira, E. M., de Medeiros, R. L., Costa, P. M. D. A., ca**
- **& Pereira, W. E. (2019).** Production and quality of okra produced with mineral and organic fertilization. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, *23*(2), 97-102.
- **Saseetharan, N.H.M., L. Zakaria . (2014)** . Occrrence of *Fusarium spp*. On vegetable Crop and Assessment of their pathogenicity pertanika .JTrop. Agric . Sci. 37 : 445 – 455.
- **Schuster, A., & Schmoll, M. (2010).** Biology and biotechnology of Trichoderma. Applied microbiology and biotechnology, 87(3), 787-799.
- **Segarra, G., Casanova, E., Avilés, M., & Trillas, I. (2010).** Trichoderma asperellum strain T34 controls Fusarium wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. Microbial ecology, 59(1), 141-149.
- **Seiboth B, Karimi RA, Phatale PA, et al (2012).** The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in Trichoderma reesei. Mol Microbiol.;84(6):1150–1164
- **Sha, S., Liu, L., Pan, S., & Wang, W. (2013).** Isolation and purification of antifungal components from Trichoderma harzianum ferment broth by high-speed counter-current chromatography. Chinese Journal of Biological Control, 29(1), 83-88.
- **Sharma, P., Kumar, V., Ramesh, R., Saravanan, K., Deep, S., Sharma, M., ... & Dinesh, S. (2011).** Biocontrol genes from *Trichoderma* species: a review. African Journal of Biotechnology, 10(86), 19898-19907.
- **Shentu, X., Zhan, X., Ma, Z., Yu, X., & Zhang, C. (2014).** Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma*

*brevicompactum* from garlic. Brazilian journal of microbiology, 45(1), 248-254.

- **Shi, M., Chen, L., Wang, X. W., Zhang, T., Zhao, P. B., Song, X. Y., ... & Zhang, Y. Z. (2012).** Antimicrobial peptaibols from Trichoderma pseudokoningii induce programmed cell death in plant fungal pathogens. Microbiology, 158(1), 166-175.
- **Shi, Y., Shentu, X., & Yu, X. (2009).** Identification of an endophytic fungus isolated from Ilex cornuta and the biocontrol effects of its secondary metabolite. Acta Phytopathologica Sinica, 39(4), 362-367.
- **Shimada, A., Inokuchi, T., Kusano, M., Takeuchi, S., Inoue, R., Tanita, M., & Fujioka, S. (2004).** 4-Hydroxykigelin and 6-demethylkigelin, root growth promoters, produced by Aspergillus terreus. Zeitschrift für Naturforschung C, 59(3-4), 218-222.
- **Shoresh, M., Harman, G. E., & Mastouri, F. (2010).** Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Annual review of phytopathology, 48, 21-43.
- **Shukla, R., Chand, S., & Srivastava, A. K. (2005).** Batch kinetics and modeling of gibberellic acid production by Gibberella fujikuroi. Enzyme and Microbial Technology, 36(4), 492-497.
- **Singh, P., Singh, J., Rajput, R. S., Vaishnav, A., Ray, S., Singh, R. K., & 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.
- **Singh, R., Ong-Abdullah, M., Low, E. T. L., Manaf, M. A. A., Rosli, R., Nookiah, R., & Sambanthamurthi, R. (2013).** Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds. Nature, 500(7462), 335-339.

- **Sivan, A., Elad, Y., & Chet, I. (1984).** Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. Phytopathology, 74(4), 498-501.
- **Snyder, W. C. and Hansen, H. N (1954).** Variation and speciation in the genus *Fusarium* .Annals of the New York Academy of Sciences 60(1):16-23.
- **Taiz .L and E. Zeiger (2002).** Plant Physiology. 3rd ed , Publisher Sinauer Associates 690 pp.
- **Tamura, K. G. Stecher, D. Peterson, A. Fillpaski & S.Kumar (2013).** MEGA 6 : Moleculer Evolutionary Genetics Analysis Version 6 . Mol.Bio. and Ev. 30: 2775-2729
- **Tijerino, A., Cardoza, R. E., Moraga, J., Malmierca, M. G., Vicente, F., Aleu, J., & Hermosa, R. (2011).** Overexpression of the trichodiene synthase gene tri5 increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. Fungal Genetics and Biology, 48(3), 285-296.
- **Tjamos, E. C., Tjamos, S. E., & Antoniou, P. P. (2010).** Biological management of plant diseases: highlights on research and application. Journal of plant pathology, S17-S21.
- **Vessey, J. K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and soil, 255(2), 571-586.
- **Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008).** *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. Soil biology and Biochemistry, 40(1), 1-10.
- **Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Woo, S., & Lorito, M. (2012).** *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. Natural product communications, 7(11), 1934578X1200701133.

- **Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Woo, S. L., Nigro, M., Marra, R., ... & Lorito, M. (2014).** *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. The Open Mycology Journal, 8(1).
- **Waghunde, R. R., Shelake, R. M., & Sabalpara, A. N. (2016).** *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. African journal of agricultural research, 11(22), 1952-1965.
- **Warcup, J. H. (1957).** Studies on the occurrence and activity of fungi in a wheat-field soil. Transactions of the British Mycological Society, 40(2), 237-IN3.
- **Watts, R., Dahiya, J., Chaudhary, K., & Tauro, P. (1988).** Isolation and characterization of a new antifungal metabolite of *Trichoderma reesei*. Plant and Soil, 107(1), 81-84.
- **Weindling, R. (1932).** *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology, 22(8), 837-845.
- **Weindling, R., & Emerson, O. H. (1936).** The isolation of a toxic substance from the culture filtrates of *Trichoderma*.
- **Wells, H. D., Bell, D. K., & Jaworski, C. A. (1972).** Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for Sclerotium rolfsii. Phytopathology.
- **Westerberg, U. B., Bolcsfoldi, G., & Eliasson, E. V. A. (1976).** Control of transfer RNA synthesis in the presence of inhibitors of protein synthesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis, 447(2), 203-213.
- Whipps, J. M. (1997). Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. Advances in botanical research, 26, 1-134.
- **Widden, P., & Abitbol, J. J. (1980).** Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce-forest soil. Mycologia, 72(4), 775-784.

- **Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997).** Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. Biotechniques, 22(3), 474-481.
- **Wilkins, K., Nielsen, K. F., & Din, S. U. (2003).** Patterns of volatile metabolites and nonvolatile trichothecenes produced by isolates of *Stachybotrys, Fusarium, Trichoderma, Trichothecium* and Memnoniella. Environmental science and pollution research, 10(3), 162-166.
- **Windham, M. T., Elad, Y., & Baker, R. (1986).** A mechanism for increased plant growth induced by Trichoderma spp. Phytopathology, 76(5), 518-521.
- **Wolffhechel, H., & Funck Jensen, D. (1992).** Use of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium vitens* for the Biological Control of Post-emergence Damping- off and Root Rot of Cucumbers Caused by *Pythium ultimum*. Journal of Phytopathology, 136(3), 221-230.
- **Wonglom, P., Ito, S. I., & Sunpapao, A. (2020).** Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity, defense response and promote plant growth in lettuce (Lactuca sativa). Fungal Ecology, 43, 100867.
- **Yang, Z. S., Li, G. H., Zhao, P. J., Zheng, X., Luo, S. L., Li, L., ... & Zhang, K. Q. (2010).** Nematicidal activity of *Trichoderma spp*. and isolation of an active compound. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26(12), 2297-2302.
- **Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y., & Chet, I. (2001).** Effect of Trichoderma harzianum on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant and soil, 235(2), 235-242.
- **Zamioudis, C., & Pieterse, C. M. (2012).** Modulation of host immunity by beneficial microbes. Molecular Plant-Microbe Interactions, 25(2), 139-150.

**ملحق (1): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma reesei isolate Y.N.126.Saad* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI ) ضمن بيانات GenBank**

NCBI Resources How To

# *Trichoderma reesei isolate Y.N.126.Saad* small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ837930.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       MZ837930                1652 bp    DNA     linear   PLN
24-AUG-2021
DEFINITION  Trichoderma reesei small subunit ribosomal RNA gene,
partial
            sequence.
ACCESSION   MZ837930
VERSION     MZ837930.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)
  ORGANISM  Trichoderma reesei
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales;
Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1652)
  AUTHORS   Alhamiri,Y.N.
  TITLE     Molecular diagnosis of Trichoderma spp in iraq
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1652)
  AUTHORS   Alhamiri,Y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (19-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..1652
                     /organism="Trichoderma reesei"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.126.Saad"
                     /db_xref="taxon:51453"
     rRNA            <1..>1652/product="small subunit ribosomal RNA" ORIGIN
```

ملحق (2): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma reesei isolate Y.N.127.Saad* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI ) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

# *Trichoderma reesei isolate Y.N.127.Saad* small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ831521.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       MZ831521                1652 bp    DNA     linear   PLN
24-AUG-2021
DEFINITION  Trichoderma reesei isolate Y.N.127.Saad small subunit
ribosomal RNA
            gene, partial sequence.
ACCESSION   MZ831521
VERSION     MZ831521.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)
  ORGANISM  Trichoderma reesei
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales;
Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1652)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (19-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..1652
                     /organism="Trichoderma reesei"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.127.Saad"
                     /db_xref="taxon:51453"
     rRNA            <1..>1652
                     /product="small subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
```

ملحق (3): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma pseudokoningii isolate Y.N.128.Saad* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI ) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

# *Trichoderma pseudokoningii isolate Y.N.128.Saad* small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ837929.1

FASTA Graphics

```
LOCUS       MZ837929                1654 bp    DNA     linear   PLN
24-AUG-2021
DEFINITION  Trichoderma pseudokoningii small subunit ribosomal RNA
gene,
            partial sequence.
ACCESSION   MZ837929
VERSION     MZ837929.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma pseudokoningii
  ORGANISM  Trichoderma pseudokoningii
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales;
Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1654)
  AUTHORS   Alhamiri,Y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (19-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..1654
                     /organism="Trichoderma pseudokoningii"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.128.Saad"
                     /db_xref="taxon:317029"
     rRNA            <1..>1654
                     /product="small subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
```

ملحق (4): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma reesei isolate Y.N.129.saad* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI ) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

# *Trichoderma reesei isolate Y.N.129.saad*. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ970766.1

FASTA Graphics

```
LOCUS       MZ970766                1651 bp    DNA     linear   PLN
05-SEP-2021
DEFINITION  Trichoderma reesei isolate Y.N.129.saad. small subunit
ribosomal
            RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   MZ970766
VERSION     MZ970766.1
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.129.saad."
                     /db_xref="taxon:51453"
     rRNA            <1..>1651
                     /product="small subunit ribosomal RNA" ORIGIN
```

ملحق (5): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma viridescens isolate Y.N.130.saad* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI ) ضمن بيانات GenBank *.shahad*

NCBI Resources How To

# *Trichoderma viridescens isolate Y.N.130.saad*. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ970842.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       MZ970842                1650 bp    DNA     linear   PLN
05-SEP-2021
DEFINITION  Trichoderma viridescens isolate Y.N.130.saad. small subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   MZ970842
VERSION     MZ970842.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma viridescens
  ORGANISM  Trichoderma viridescens
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales;
Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1650)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Molecular diagnosis of Trichoderma spp in iraq
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1650)
  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..1650
                     /organism="Trichoderma viridescens"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.130.saad."
                     /db_xref="taxon:398679"
     rRNA            <1..>1650
                     /product="small subunit ribosomal RNA" ORIGIN
```

ملحق (6): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma harzianum isolate Y.N.131.saad* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI ) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

# *Trichoderma harzianum isolate Y.N.131.saad*. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ994502.1

FASTA Graphics

```
LOCUS       MZ994502                1649 bp    DNA     linear   PLN
07-SEP-2021
DEFINITION  Trichoderma harzianum isolate Y.N.131.saad. small subunit
ribosomal
            RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   MZ994502
VERSION     MZ994502.1
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.131.saad."
                     /db_xref="taxon:5544"
     rRNA            <1..>1649
                     /product="small subunit ribosomal RNA" ORIGIN
```

ملحق (7): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma asperellum isolate Y.N.132.saad* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI ) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

# *Trichoderma asperellum isolate Y.N.132.saad*. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ970841.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       MZ970841                1652 bp    DNA     linear   PLN
05-SEP-2021
DEFINITION  Trichoderma asperellum isolate Y.N.132.saad. small
subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   MZ970841
VERSION     MZ970841.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma asperellum
  ORGANISM  Trichoderma asperellum
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
          Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1652)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Molecular diagnosis of Trichoderma spp in iraq
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1652)
  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..1652
                     /organism="Trichoderma asperellum"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.132.saad."
                     /db_xref="taxon:101201"
     rRNA            <1..>1652
                     /product="small subunit ribosomal RNA" ORIGIN
```

ملحق (8): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma reesei isolate Y.N.133.saad.* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI ) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

# *Trichoderma reesei isolate Y.N.133.saad.* small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ970840.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       MZ970840                1652 bp    DNA     linear   PLN
05-SEP-2021
DEFINITION  Trichoderma reesei isolate Y.N.133.saad. small subunit
ribosomal
            RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   MZ970840
VERSION     MZ970840.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)
  ORGANISM  Trichoderma reesei
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Hypocreaceae;
            Trichoderma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1652)
  AUTHORS   alhamiri,y.N.
  TITLE     Molecular diagnosis of Trichoderma spp in iraq
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1652)
  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..1652
                     /organism="Trichoderma reesei"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N.133.saad."
                     /db_xref="taxon:51453"
     rRNA            <1..>1652
                     /product="small subunit ribosomal RNA" ORIGIN
```

ملحق (9): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Trichoderma reesei isolate Y.N.134.saad.* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI ) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

# *Trichoderma reesei isolate Y.N.134.saad.* small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ994500.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       MZ994500                1649 bp    DNA     linear   PLN
07-SEP-2021
DEFINITION  Trichoderma reesei isolate Y.N.134.saad. small subunit ribosomal
            RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   MZ994500
VERSION     MZ994500.1
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.134.saad."
                     /db_xref="taxon:51453"
     rRNA            <1..>1649
                     /product="small subunit ribosomal RNA" ORIGIN
```

## Abstract

The study was conducted in the laboratories of the College of Agriculture, University of Karbala, during the academic season 2020-2021. The results of isolation and diagnosis from soil samples showed occurrence 42 isolates belong to *Trichoderma* spp, with an occurrence rate of 42% and a frequency of 7.60%. A number of fungi accompanying the infected okra roots were isolated from different regions in the province of Karbala. The percentage of occurrence and frequency varied among different fungi, as the fungus *Fusarium* spp had the highest percentage of occurrence 4%.

The results of the pathogeni ability test of the pathogenic fungi isolated from the infected okra plant showed a different pathogenicity when tested on cabbage seeds germination. The fungus *M.phaseolina* showed a significant effect on the percentage of germination, which was 6.6% with an inhibition rate of 93.5%, followed by the fungus *AIternaria* spp, which had a significant effect on seeds germination to be 26.6% with inhibition rate of 72%, then the fungus *Fusarium* spp which reduced the percentage of germination to 30% resulting in an inhibition of 67.7% compared to the control treatment that did not record any inhibition on seeds germination. When testing the antagonistic ability of *Trichoderma* spp isolates against pathogenic fungi, the results showed that *Trichoderma* spp isolates had a high ability to inhibit the pathogenic *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. and *M.phaseolina*, where the inhibition rate ranged from 90% to-33%. On the other hand, the fungal filtrate of the biological control fungus showed different inhibition ability, where the highest effect was for iolate T.N2 filtrate showing an inhibition rate of 88.8% on *M.phaseolina*. The lowest inhibition was 41.6% in the filtrate of the isolate T.S3 on *Alternaria* spp.

As for the ability of *Trichoderma* spp. isolates to produce plant growth regulators (GA3 and IAA), the results showed that all the nine isolates were able to produce growth regulators in different ways. Isolate T.N2 showed the highest production of gibberellin at a concentration of 290 µg/ml, while isolate H9 had the lowest production with a concentration of 30 µg/ml. Similarly, different isolates differed in their ability to produce the growth regulator IAA. Isolate T.S10. was significantly higher compared to all isolates in producing growth regulator at a concentration of 260 µg/ml, while isolate H3 was the lowest in production resulted in a concentration of 90 µg/ml.

The results of the detection of Trichodermin showed a significant difference in the concentrations of the mycotoxin produced from different isolates, where the concentration of Trichodermin ranged between 60 and 331 µg/gm. In general, the isolate T.H9 was significantly higher in Trichodermin secretion than all the other isolates .When testing the antagonism among the five fungal isolates on PDA medium, the results did not show any antagonism between the T.B6 ,T.H9and T.N2 isolates under study, but show the two isolates T.H3 and T.D8 antagonism .

The results of the field experiment of adding biological preparations to the fungal isolates showed a significant increase in its effect on the percentage of germination of okra seeds and a decrease in the percentage of seedling death compared to the treatment of the two pathogenic fungi. Only the fungus *Fusarium* sp and *Macrophomina phaseolina* reached 0.39 and 0.5 g, respectively.

As for okra seedling length, all treatments had a significant effect on increasing plant height, which ranged between 18-28 cm, compared to treatment of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* sp only, which reached 15 and 11.5 cm, respectively, and all treatments achieved except (A T.B6+, T.H9+A, T.N2+M)

Significant increase compared to the control treatment, which amounted to 17 cm. As for root length, there was no significant effect on root length, which ranged between 2-4 cm, compared to the treatment of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*, which was 1.5 compared to the control treatment, which was 1.8 cm . As for the treatment with the pathogenic fungus *Fusarium* sp, it had a significant effect in increasing the root length compared to the control treatment, which amounted to 1.8 cm. The results showed the effect of the treatments with a significant increase in the length of the shoot, which ranged between (16-25) cm compared to the treatment of the fungus *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* sp, and the control amounted to 13.5, 10, 15.4 cm, except for T.N2+A, which did not show a significant effect.

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

# Study the relatedness between trichodermin production level and *Trichoderma* sp ability to resistance okra damping off Pathogens of and growth regulators activity aganst on them

**By**
**Saad Ahmed Alwan Altai**

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**

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