جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة كربلاء
كلية الزراعة
قسم وقاية النبات

التكامل بين المضادات الحيوية Gliotoxin و Trichodermin والعزلات المنتجة لها من الفطر *Trichoderma* spp في تصنيع مبيد حيوي ضد مسببات مرض تعفّن البذور وموت بادرات القطن

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

من قبل

أيمن جاسم مهدي الصليخي

بإشراف

أ.د. ياسر ناصر حسين الحميري

2022 م **1444 هـ**

بسم الله الرحمن الرحيم

وَإِذَا سَأَلَكَ عِبَادِي عَنِّي فَإِنِّي قَرِيبٌ أُجِيبُ دَعْوَةَ الدَّاعِ
إِذَا دَعَانِ فَلْيَسْتَجِيبُوا لِي وَلْيُؤْمِنُوا بِي لَعَلَّهُمْ يَرْشُدُونَ

صدق الله العلي العظيم

سورة البقرة : اية(١٨٦)

الإهداء . . .

إلى . . . . . سيد المرسلين وخاتم النبيين وسيد الخلق أجمعين نبينا محمد صلى الله

عليه وعلى آله الطيّبين الطاهرين وسلم تسليما كثيرا

إلى . . . . . سيد الأوصياء وأمير المؤمنين إمامنا الإمام علي بن أبي طالب عليه السلام

إلى . . . . . صاحب الأمر ومنقذ البشرية الإمام المهدي عجل الله فرجه

إلى . . . . . من حملتني في كبدها وحضنتني بقلبها وبذلت الغالي والنفيس حتى ذابت وذبلت لأجلي نوري

ودنيتي واخرتي أمي

إلى . . . . . أعمدتي وأركاني اخوتي

إلى . . . . . فلذّتي كبدي ولدي علي المهدي وأحمد

أهدي هذا الجهد المتواضع .

ايمن جاسم مهدي

شكر وتقدير

الحمد لله والشكر له ربّ العالمين الخالق العظيم من بيده مجرى الأمور وبه استعين وعليه توكلي ومستجيب دعائي ورافع عني الهمّ والغمّ وصعاب الأمور حمدا وشكرا لا تطيقه السموات والأرض على نعمائه ربي التي لاتعد ولاتحصى، والصلاة والسلام على خاتم النبين وسيد المرسلين وشفيع الامة حبيب آله العالمين نبي الرحمة محمد وعلى آله الطاهرين المنتجبين أئمة الهدى وابواب الرحمة.

اتقدم بالشكر الجزيل والثناء الجميل إلى أستاذي ومشرفي الأستاذ الدكتور ياسر ناصر حسين الحميري لما قدمه من توجيهات راقية وما بذله من جهود مستمرة ونصائح علمية فريدة ومعلومات قيمّة دعمتني طول مّدة عملي واثرت موضوع دراستنا في جوانبها المختلفة فكان اخا ناصحا وموجها حريصا فجزاه الله عني خير الجزاء ونسأل الله له التوفيق ودوام الصحة والعافية بحق محمد وآل محمد.

اتقدم بالشكر الجزيل إلى السيد عميد كلية الزراعة الدكتور ثامر كريم الجنابي وكافة منتسبيها لما قدموه من تسهيلات لأتمام الرسالة . وأتقدم بخالص الشكر للسيد رئيس قسم وقاية النبات وجميع التدريسين والمنتسبين واخص بالذكر الدكتورة رجاء غازي والدكتور محسن عبد علي محسن والدكتور عدنان عبد الجليل لهوف والدكتور عقيل نزال والأستاذ علاء طالب والأستاذ كرار عبد الزهرة لما قدموه من مساعدة ودعم خلال مدة الدراسة . كما أتقدم بوافر الشكر والامتنان إلى رئيس وأعضاء لجنة المناقشة لتفضلهم بقبول قراءة ومناقشة موضوع الرسالة . كما اشكر الأستاذ سرمد عبد الله مدير حسابات الكلية. والشكر الجزيل إلى جميع زملائي وزميلاتي اللذين هم بمثابة اخوتي الذين ساندوني خلال مدة الدراسة وخصوصاً مرتضى عبد الرزاق و علاء عباس نسأل الله لهم دوام الموفقية والصحة والسلامة . الشكر والثناء إلى اهلي والدتي واخوتي لما قدموه لي من سند بعد الله سند معنوي ومادي كانوا حاضرين في جميع مراحل دراستي وما احاطها من ظروف.

واخص بالشكر السيد عميد كلية الصيدلة الأستاذ الدكتور احمد صالح الخزعلي المحترم لدعمه المعنوي المستمر لي كما اتاح لي جميع التسهيلات في عملي داخل مختبرات كلية الصيدلة .

الباحث

اقرار المشرف

أشهد بأن الرسالة الموسومة (التكامل بين المضادات الحيوية Gliotoxin و Trichodermin والعزلات المنتجة لها من الفطر *Trichoderma* spp في تصنيع مبيد حيوي ضد مسببات مرض تعفن البذور وموت بادرات القطن) التي قدمها الطالب (أيمن جاسم مهدي الصليخي) قد تم اعدادها بإشرافي في كلية الزراعة/ جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في العلوم الزراعية / وقاية النبات.

المشرف

أ.د ياسر ناصر حسين الحميري

كلية الزراعة – جامعة كربلاء

بناءً على الشروط والتوصيات المتوفرة ارشح هذه الرسالة للمناقشة.

أ.م.د علي عبد الحسين

رئيس قسم وقاية النبات

اقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة اطلعنا على هذه الرسالة والموسومة (التكامل بين المضادات الحيوية Gliotoxin و Trichodermin والعزلات المنتجة لها من الفطر *Trichoderma* spp في تصنيع مبيد حيوي ضد مسببات مرض تعفن البذور وموت بادرات القطن) وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها ووجدنا أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية (وقاية النبات).

رئيس اللجنة

أ.د. رجاء غازي عبد المحسن

كلية الزراعة / جامعة كربلاء

عضواً

أ. د. عهد عبد علي هادي

الكلية التقنية المسيب/ جامعة الفرات الأوسط التقنية

عضواً

أ.م.د. محسن عبد علي محسن

كلية الزراعة / جامعة كربلاء

المشرف /عضواً

أ.د. ياسر ناصر حسين الحميري

كلية الزراعة / جامعة كربلاء

صدقت الرسالة من مجلس كلية الزراعة – جامعة كربلاء.

أ.د. ثامر كريم خضير الجنابي

العميد وكالة

المستخلص

اجريت هذه الدراسة في مختبرات وحقول كلية الزراعة جامعة كربلاء في الموسم الزراعي 2021-2022 .بهدف تصنيع مبيد حيوي (Four.T)من بعض عزلات الفطر *Trichoderma* spp لمقاومة مرض تعفن البذور وموت بادرات القطن .

بينت نتائج العزل لأربع مناطق مختلفة تم زراعتها في محافظة كربلاء، وجود الفطرين *Fusarium* spp , *Rhizoctonia* spp بأعلى نسبة بلغ 75% لكل منهما ، تلاها وجود الفطريات *Pythium* spp. و *Alternaria* sp. و*Verticillum* sp وبنسب (50 %، 25% ، 12.5%) على التوالي . اذ اظهرت نتائج اختبار المقدرة الامراضية تفوق ضراوة الفطريات *Fusarium brachygibbosum* و *Fusarium solani* و*Alternaria alternata* في مهاجمة بذور وبادرات القطن ومنعت الانبات بشكل كامل . حيث بلغت نسبة انبات البذور فيها 0.0 % وبنسبة تثبيط بلغت 100%.

شخصت العزلات مظهريا استنادا للصفات المجهرية وتم تشخيص العزلات الأكثر امراضية منها جزيئيا عن طريق تحليل تسلسل قواعد الحامض النووي لمنطقة ITS بعد ارسالها الى شركة Macrogen الكورية الجنوبية لغرض تحديد التتابع النيوكلوتيدي وكان رقم الإيداع لهذه العزلات في بنك الجينات (ON738702)، (ON738704)، (ON738701) للعـــــــزلات *F. brachygibbosum* ، *F. solani* ، *A.alternata* على التوالي ومقارنة كل عزلة بالعزلات المشخصة عالميا في بنك الجينات .

اثبتت عزلات الفطر *Trichoderma spp.*كفاءة عالية ضد المسببات المرضية *F.brachygibbosum* ، *F.solani* , *A.alternata* إذ تراوحت نسبة التثبيط (40.62-94.44%) ،اذ بلغت اعلى مقدرة تضادية 94.44% للعزلة *T. koningiopsis* ضد الفطر الممرض *F. brachygibbosum* كما أوضحت نتائج استخلاص السموم من رواشح عزلات *Trichoderma spp* المستخدمة في الدراسة عن وجود السموم الفطرية Trichodermin وGliotoxin وبمقادير كبيرة ، وكان لها الدور الكبير في تثبيط نمو الفطريات الممرضة ، حيث تراوحت نسبة التثبيط (69.44-86.11) وبلغت أعلى نسبة للتثبيط 86.11% للعزلة *T.viride* ضد الفطر الممرض *A.alternata* .

بينما بينت نتائج التجارب الحقلية دور عزلات الفطر *Trichoderma spp.* والمبيد الحيوي (FOUR.T) في السيطرة على المسببات المرضية فقد أظهرت زيادة معنوية في النسبة المئوية

لأنبات بذور القطن وخفض النسبة المئوية لتعفن البذور وموت البادرات قياسا بمعاملة المقارنة للفطريات الممرضة فكانت اعلى نسبة انبات بلغت 100% ونسبة تثبيط 0.00% والنسبة المئوية للإصابة 3.33% عند استخدام المبيد الحيوي (FOUR.T) المحضر من العزلات (*T. viride* و *T.pseudokoningii* و*T.koningiopsis* و *T. reesei*) ضد المسببات المرضية .

وكذلك اثرت عزلات الفطر *Trichoderma spp.* والمبيد الحيوي (FOUR.T) بشكل معنوي في معايير النمو النباتية حيث أظهرت النتائج زيادة الوزن الطري والجاف للجموع الخضري والجذري لبادرات القطن، اذ تراوح الوزن الطري بين (3- 6غم)، قياسا بمعاملة العزلات *F.brachygibbosum* ، *F. solani*, *A. alternate* التي بلغت 0.5 و1 و1غم على التوالي.

أظهرت نتائج استحثاث المقاومة الجهازية ان لعزلات الفطر *Trichoderma spp* والمبيد الحيوي (FOUR.T) تأثير كبير في استحثاث المقاومة الجهازية للنبات في زيادة فاعلية انزيم البيروكسيديز والبولي فينول اوكسديز و الفينولات وزيادة في قيمة الكلوروفيل الكلي ،إذ تراوحت فاعلية انزيم البولي فينول اوكسيديز(1.29-1.66)، بينما تراوحت قيمة الكلوروفيل (0.72-0.86) وحدة / غم وزن طري، كما تراوح فاعلية انزيم البيروكسيد 0.383-0.528 (وحدة / غم وزن طري)، وتراوحت قيمة الفينولات 0.32-0.46 (ملغم / غم وزن طري) ، فكان اعلى فاعلية لانزيم البيروكسيد 0.528 في معاملة المستحضر الحيوي ، وكذلك للكلوروفيل والفينولات فكانت 0.86 ،0.46 ، على التوالي ، وكان اعلى فاعلية في معاملة المبيد الحيوي ضد *A. alternate* ، والمعاملة بعزلة الفطر *T. reesei* ضد الممرض *F.solani* .

قائمة المحتويات

التسلسل	العنوان	رقم الصفحة
1	**المقدمة**	1
2	**مراجعة المصادر**	4
1-2	تصنيف الفطر الاحيائي *Trichoderma* spp	4
2-2	المقاومة الاحيائية Biological Control	5
3-2	استخدامات الفطر *Trichoderma spp* في المقاومة الحيوية	5
4-2	اليات المقاومة الحيوية للفطر *Trichoderma*	6
1-4-2	التطفل الفطري	6
2-4-2	التضاد الفطري في الفطر ***Trichoderma***	7
3-4-2	التنافس	7
4-4-2	قدرة الفطر *Trichoderma* على استحثاث المقاومة لدى النبات	7
5-4-2	تحور منطقة الجذر	8
6-4-2	تأثير الفطر *Trichoderma* في نمو النبات	8
5-2	استعمالات الفطر *Trichoderma*	9
1-5-2	الاستعمالات الزراعية	9
2-5-2	الاستعمالات الصناعية	9
3-5-2	استخدام الفطر *Trichoderma* في التقانات الاحيائية	10
4-5-2	التخليق الحيوي للجسيمات النانوية باستخدام جنس الترايكوديرما	10
5-5-2	استخدام الفطر *Trichoderma* في التحطيم الحيوي للمبيدات الكيميائية	11
6-2	مركبات الايض الثانوي في الفطريات وتأثيرها في البيئة	11
7-2	مركبات الايض الثانوي في الفطر *Trichoderma*	12
1-7-2	المضادات الحيوية	13
2-7-2	السموم الفطرية	13
3-7-2	المضاد الحيوي Trichodermain	14
4-7-2	المضاد الحيوي Gliotoxin المنتج من قبل الفطر *Trichoderma* spp	16
8-2	التصنيع الحيوي لمستحضر الفطر *Trichoderma* spp	17
1-8-2	الاوساط التخمرية والمواد الحاملة المستعملة في تنمية واكثار فطر المقاومة الاحيائية	18

2-8-2	أشكال تجهيز المستحضرات الاحيائية	19
3-8-2	الاجسام الحجرية التي تنتجها أنواع الفطر *Trichoderma* واستخدامها في المبيد الحيوي	20
9-2	مرض تعفن بذور وموت بادرات القطن	21
10-2	مكافحة مرض تعفن بذور وموت بادرات القطن باستخدام أنواع من الفطر *Trichoderma spp*	22
11-2	توليفة من عزلات الفطر *Trichoderma* وتأثيرها على الفطريات الممرضة	23
12-2	استخدام التقانات الجزيئية في تشخيص الفطريات	24
13-2	قواعد البيانات البيولوجية National Center for Biotechnology Information (NCBI) وبرنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	25
14-2	الشجرة الوراثية Phylogenetic Tree واستخدامها في الكشف الجزيئي عن العلاقة الوراثية بين العزلات الفطرية	25
3	**المواد وطرائق العمل**	26
1-3	الأجهزة والادوات والمواد المستخدمة في أجراء التجارب	26
2-3	تحضيرالأوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص وتنمية الفطريات	29
1-2-3	وسط البطاطا سكروز اكار Potato Sucrose Agar (P.S.A)	29
2-2-3	وسط البطاطا دكستروز آكار الجاهز Potato Dextrose Agar P.D.A.	30
3-2-3	وسط البطاطا سكروز السائل Potato Sucrose Broth (P.S.B.)	30
4-2-3	وسط الرز	30
5-2-3	وسط الدخن	30
6-2-3	وسط جريش الذرة الصفراء	31
7-2-3	وسط البطاطا جزر اكار	31
8-2-3	وسط البتموس	31
9-2-3	وسط الشعيراكار ببتون	31
3-3	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لتعفن البذور وموت بادرات القطن	32
1-3-3	زراعة بذور القطن	32
2-3-3	جمع العينات	32
3-3-3	عزل الفطريات الممرضة من بذور وبادرات القطن المصابة	33
4-3	تنقية وتشخيص الفطريات المعزولة	33

5-3	حفظ العزلات الفطرية المعزولة	34
6-3	اختبار المقدرة الامراضية لعزلات الفطر *Fusarium* sp. و *Rhizoctonia* sp. و *Pythium* sp. و *Alternaria* sp. و *Verticillum* sp. مختبرياً	34
7-3	التشخيص الجزيئي لعزلات الفطريات الأكثر امراضية على نبات القطن	35
8-3	تحضير اللقاح الفطري لكل من العزلات الفطرية المرضية	36
9-3	اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد العزلات الفطرية الممرضة مختبريا.	36
10-3	اختبار التداخل بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp	37
11-3	الكشف عن قابلية عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma sp* المنتخبة على انتاج السمين الفطريين Trichodermin وGliotoxin	39
12-3	التقدير الكمي والنوعي للسمين Trichodermin و Gliotoxin باستخدام تقانة كروموتوكرافيا السائل فايق الأداء High Performance (HPLC) Liquid Chromatography	39
13-3	القدرة التثبيطية للسمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin في نمو العزلات الفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA	40
14-3	الكشف عن قابلية عزلات الفطر *Trichoderma sp* على تكوين الاجسام الحجرية ودعم المستحضر الحيوي بها	41
15-3	تحضير المبيد الحيوي لعزلات الفطر *Trichoderma* spp.	41
16-3	اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin ضد العزلات الفطرية الممرضة حقلياً في الاصص البلاستيكية	42
17-3	اختبار دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. في استحثاث المقاومة الجهازية في بادرات القطن ضد ممرضات تعفن البذور وموت البادرات	45
1-17-3	قياس فعالية انزيم بولي فينول اوكسيديز Poly Phenol (PPO) Oxidase	45
2-17-3	قياس فعالية انزيم البيروكسيديز الـ Peroxidase (POD)	46
3-17-3	قياس فعالية الفينول الكلي	47
4-17-3	تقدير الكلوروفيل الكلي	47
18-3	التصاميم الإحصائية للتجارب المختبرية والحقلية	48
4	**النتائج والمناقشة**	49
1-4	عزل وتشخيص الفطريات الممرضة المرافقة لتعفن البذور وموت بادرات القطن	49
2-4	الوصف المظهري لاهم المسببات المعزولة	51

3-4	اختبـــار المقـــدرة الامراضـــية لعـــزلات الفطـــر *Fusarium* spp. و *Rhizoctonia* spp. و *Pythium* spp. و *Alternaria* sp. و *Verticillum* sp باستخدام بذور القطن مختبرياً	54
4-4	التشخيص الجزيئي و تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلات الفطريات الممرضة والمسببة لتعفن البذور وموت بادرات القطن	57
1-4-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *Alternaria alternata* Y.N.146 (Aymen) ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس النوع .	58
2-4-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *Fusarium brachygibbosum* (Y.N.147Aymen) ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية االعالمية لنفس الفطر	59
3-4-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *Fusarium solani* (Y.N.148 (Aymen) ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية االعالمية لنفس الفطر	61
5-4	اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	63
6-4	اختبار تأثير التداخل بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp	67
7-4	الكشف عن قابلية عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma sp* المنتخبة على انتاج السمين الفطريين Trichodermin وGliotoxin	70
8-4	تاثير السمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin في تثبيط النمو القطري لعزلات الفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA مختبريا	73
9-4	الكشف عن قابلية عزلات الفطر *Trichoderma sp* على تكوين الاجسام الحجرية ودعم المبيد الحيوي بها	74
10-4	تصنيع المبيد الحيوي لعزلات الفطر *Trichoderma* spp.	76
11-4	اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin مع المبيد الحيوي (FOUR.T) ضد مسببات مرض تعفن البذور وموت بادرات القطن حقلياً في الاصص البلاستيكية	78
1-11-4	اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin مع المبيد الحيوي (FOUR.T) ضد الفطر *Fusarium.brachygibbosum* حقلياً في الاصص البلاستيكية	78
2-11-4	اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin مع المبيد الحيوي (FOUR.T) ضد الفطر *Alternaria alternata* حقلياً في	84

	الاصص البلاستيكية	
3-11-4	اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin مع المبيد الحيوي (FOUR.T) ضد الفطر *Fsarium solani* حقلياً في الاصص البلاستيكية	89
12-4	اختبار دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. والمبيد الحيوي (FOUR.T) في استحثاث المقاومة الجهازية في بادرات القطن ضد ممرضات تعفن البذور وموت البادرات	94
1-12-4	اختبار دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. والمبيد الحيوي (FOUR.T) في استحثاث المقاومة الجهازية في بادرات القطن ضد الفطر *A.alternata*	94
2-12-4	اختبار دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. والمبيد الحيوي (FOUR.T) في استحثاث المقاومة الجهازية في بادرات القطن ضد الفطر *F.solani*	97
3-12-4	اختبار دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. والمبيد الحيوي (FOUR.T) في استحثاث المقاومة الجهازية في بادرات القطن ضد الفطر *F.brachygibbosum*	99
5	**الاستنتاجات والتوصيات**	101
1-5	**الاستنتاجات**	101
2-5	**التوصيات**	102
6	**المصادر**	103
1-6	**المصادر العربية**	103
2-6	**المصادر الاجنبية**	109
7	**الملاحق**	140

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	رقم الصفحة
جدول 1	الأجهزة والادوات المستخدمة في أجراء التجارب الواردة في البحث	26
جدول 2	المواد الكيميائية المستعملة في إجراء التجارب الواردة في هذه الدراسة	27
جدول 3	الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة	28
جدول 4	جميع الفطريات المستخدمة بالدراسة	29
جدول 5	نوع العينات وترميزها ومكان وتاريخ جمعها	32
جدول 6	ترميز عزلات الفطريات التي اظهرت مقدرة امراضية عالية وتم ارسالها الى شركة Macrogen الكورية الجنوبية للتشخيص الجزيئي	36
جدول 7	اختبار التداخل بين 6 عزلات من الفطر *Trichoderma* spp.	38
جدول 8	معاملات تاثير التوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin ضد اي من العزلات الفطرية الممرضة حقلياً	44
جدول 9	يوضح العزلات الفطرية المرافقة لحالات تعفن البذور وموت بادرات القطن.	51
جدول 10	يوضح اختبار القدرة الامراضية للفطريات المنتخبة باستخدام بذور القطن على وسط البتموس مختبريا.	55
جدول 11	التشخيص الجزيئي لعزلات الفطريات الممرضة والمسببة لامراض تعفن البذور وموت بادرات القطن باستخدام تحليل التتابع النيوكليوتيدي و Accession Number لها.	57
جدول 12	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر (*Alternaria alternata* Y.N.146 Aymen) المعزولة من محافظة كربلاء/ قضاء الحسينية وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية Fusarium spp(NCBI).	58
جدول 13	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر (*Fusarium brachygibbosum* Y.N.147Aymen) المعزولة من محافظة كربلاء/ قضاء الحسينية وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI).	60
جدول 14	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر (*Fusarium solani* Y.N.148 Aymen) المعزولة من محافظة كربلاء/ قضاء الحسينية وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI).	62

جدول 15	النسبة المئوية للتثبيط لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد الفطريات الممرضة	65
جدول 16	اختبار التداخل بين 6 عزلات من الفطر *Trichoderma* spp.	68
جدول 17	التقدير الكمي والنوعي للسمين الفطريين Gliotoxin و Trichodermin لعزلات الفطر *Trichoderma spp*	73
جدول 18	كفاءة السمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin في تثبيط النمو القطري لعزلات الفطريات الممرضة	74
جدول 19	اختبار التأثير التآزري بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في خفض نسبة وشدة الاصابة بالفطر *F.brachygibbosum* على بادرات القطن حقلياً	80
جدول 20	اختبار التأثير التآزري بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في بعض معايير النمو لبادرات القطن حقلياً والمصابة بالفطر *F.brachygibbosum*	83
جدول 21	اختبار التأثير التآزري بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في خفض نسبة وشدة الاصابة بالفطر الممرض *A.alternata* على بادرات القطن حقلياً	85
جدول 22	اختبار التأثير التآزري بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في بعض معايير النمو لبادرات القطن حقلياً والمصابة بالفطر الممرض *A.alternata*	88
جدول 23	اختبار التأثير التآزري بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في خفض نسبة وشدة الاصابة بالفطر الممرض *F.solani* على بادرات القطن حقلياً	90
جدول 24	اختبار التأثير التآزري بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في بعض معايير النمو لبادرات القطن حقلياً والمصابة بالفطر الممرض *F.solani*	93
جدول 25	دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. والمبيد الحيوي (FOUR.T) في استحثاث المقاومة الجهازية في بادرات القطن ضد الفطر *A.alternata*	96
جدول 26	دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. والمبيد الحيوي (FOUR.T) في استحثاث المقاومة الجهازية في بادرات القطن ضد الفطر *F.solani*	98
جدول 27	اختبار دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. والمبيد الحيوي (FOUR.T) في استحثاث المقاومة الجهازية في بادرات القطن ضد الفطر *F.brachygibbosum*	100

قائمة الاشكال

التسلسل	العنوان	الصفحة
1	التركيب الكيميائي للمضاد الحيوي Trichodermin	15
2	التركيب الكيميائي للمضاد الحيوي Gliotoxin	16
3	مراحل تنفيذ التجربة الحقلية لتقييم التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp والمبيد الحيوي (FOUR.T) ضد العزلات الفطرية الممرضة	46
4	الوصف المظهري لطبيعة نمو المستعمرات الفطرية والتصبغات لاهم المسببات المعزولة لحالات تعفن البذور وموت بادرات القطن	53
5	نماذج من اختبارات المقدرة الامراضية للفطريات المعزولة باستخدام بذور القطن على وسط البتموس مختبريا	56
6	الشجرة الوراثية للفطر الممرض *Alternaria alternata* Y.N.146 Aymen (محددة بنقطة ذات لون اسود) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالاضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطرالممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank. ان المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة neighbor-joining	59
7	الشجرة الوراثية للفطر الممرض *Fusarium brachygibbosum* Y.N.147Aymen (محددة بنقطة ذات لون اسود) والتي بنيت اعتمادا على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالاضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank. ان المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة neighbor-joining	61
8	الشجرة الوراثية للفطر الممرض *Fusarium solani* Y.N.148Aymen (محددة بنقطة ذات لون اسود) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالاضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank.ان المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة neighbor-joining .	63
9	المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	66
10	نماذج في اختبارالتداخل بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp	69
11	الكشف عن قابلية العزلات الفطرية الاربعة المنتخبة للفطر الاحيائي *Trichoderma sp* على انتاج السمين الفطريين Trichodermin وGliotoxin	72

12	جوانب من اختبار قابلية عزلات الفطر *Trichoderma sp* على تكوين الاجسام الحجرية	76
13	مراحل من تصنيع المبيد الحيوي (FOUR.T) لعزلات الفطر *Trichoderma* spp.	77
14	التأثير التآزري بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في خفض نسبة وشدة الاصابة بالفطر *F.brachygibbosum* على بادرات القطن حقلياً	81
15	التأثير التآزري بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في خفض نسبة وشدة الاصابة بالفطر الممرض *A.alternata* على بادرات القطن حقلياً	86
16	التأثير التآزري بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في خفض نسبة وشدة الاصابة بالفطر الممرض *F.solani* على بادرات القطن حقلياً	91

1: المقدمة

يُعدّ محصول القطن أحد أهم المحاصيل الاقتصادية في جميع أنحاء العالم ، اذ يوفر أكبر مصدر للألياف الطبيعية لصناعة النسيج (Zhang وآخرون،2022). ينتمي القطن إلى العائلة الخبازية Mavanceae وبالتحديد الى الجنس Gassypium (زيود، 2009) ، كما أنّ القطن من أهم محاصيل الألياف البذرية ويحتل موقعا متميزا بين المحاصيل الزراعية لدخوله كمادة اولية في كثير من الصناعات، وهو من اهم المحاصيل الليفية(Abbasوآخرون،2022) .تأتي اهميته في انتاج الالياف التي تستعمل في صناعة الغزل والنسيج إذ تشكل اليافه 85_90% من المصادر الأولى المنتجة للالياف (Raut وآخرون،2019 ،Khan وآخرون،2019) ،و يستخرج من بذوره الزيت المستخدم في بعض الصناعات والذي يتراوح نسبته 18-26% من وزن البذور ،فضلا عن الكسبة ومخلفاته كعلف للحيونات لاحتوائه يحتوي على نسبة عالية من النتروجين والبروتينات (القيسي ،2010 ، و AL-Omran وآخرون،2019) .

تقدر المساحة المزروعة بالقطن في العالم 33 مليون هكتار، وتتروح الطاقة الانتاجية لمحصول القطن في الوطن العربي بين 800 إلى مليون طن من القطن سنويا (زيود،2009). اما في العراق فإن انتاجية القطن متدنية بالمقارنة مع انتاجية وحدة المساحة العالمية (القيسي 2010)، وقد ارتفعت المساحة المزروعة بنسبة 2 – 4 % لتبلغ 86 طنا (الجهاز المركزي للإحصاء، وزارة الزراعة، العراق،2017).

يصاب محصول القطن بالعديد من الأمراض والآفات .ويعد مرض تعفن البذور وموت البادرات المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* (kuhn) وهو الاكثر شيوعا يليه الفطر *Fusarium* spp كذلك انواع الفطر *Pythium* spp مثل *Pythium aphanidermatum*. *P. irrigular* Bvis. , *P. myriotvlum* Drechs. *P.ultimum* ،*P. debaryanum* Hess (Bacharis وآخرون،2010) . كما سجلت قسم من الفطريات الاخرى مثل *Alternaria* sp، *Cephalosporium*، *Penicillium* *Aspergillus, Rhizopus* . كمسببات مرض تعفن البذور وموت بادرات القطن ، ومن العوامل المحددة لزراعة هذا المحصول (Gisi ،2022) .

إن السيطرة على الأمراض النباتية من العوامل الرئيسة التي يجب الاهتمام بها للحفاظ على جودة ووفرة الغذاء والأعلاف والألياف التي ينتجها المزارعون الذين غالباً ما يعتمدون على المبيدات الكيمياوية في مكافحة هذه الامراض، إلا إن التلوث البيئي الناجم عن الاستخدام المفرط لهذه المبيدات الكيمياوية أدى إلى تركيز الباحثين على تطوير مدخلات بديلة لهذه المبيدات لمكافحة

الامراض ومنها استخدام المقاومة الحيوية Biological Control (العامري ، 2021) . من بين أهم الاحياء الدقيقة المستخدمة في المكافحة الاحيائية انواع الفطر *Trichoderma* spp. بسبب نشاطه التضادي والعدائي ضد مجموعة واسعة من الكائنات المسببة للأمراض النباتية وتواجده بشكل واسع في غالبية أنواع الترب والبيئات المختلفة (Pimentel وآخرون، 2020). ويتميز بقدرته في تحسين نمو الجذور وتطورها وانتاجية المحاصيل ومقاومة الظروف البيئية المختلفة وامتصاص المغذيات (Ruangwong وآخرون ، 2021).

سجل الكثير من انواع الفطر *Trichoderma* spp منها *T.harzianum* و *T.virens* و *T.viride* وقد تم اثبات فعاليتها في السيطرة على مرض تعفن البذور و وموت البادرات في العديد من المحاصيل وخصوصا الفطريات التي تنقلها التربة مثل *Rhizoctonia* spp. , *Pythium* .spp. , *Sclerotinia* spp. , ,*Fusarium* spp. *Macrophomina* spp Vinale) وآخرون، 2014 و Kumar وآخرون ، 2017 و Pimentel وآخرون، 2020 و Misra و Ansari, 2021)

بعض انواع الفطر *Trichoderma* spp. لها القابلية على إنتاج مركبات الايض الثانوي مثل Gliovirin و Gliotoxin وTrichodermin و Viridin و Viridol و koninginins و Pyrones و Peptaibols وغيرها ، التي تتميز بقدرتها العالية في المكافحة الحيوية عن طريق إحداث موت الخلايا المبرمج في مسببات الأمراض الفطرية ، فضلا عن وصفها من المضادات الحيوية المهمة لامتلاكها القدرة التضادية والتثبيطة لنمو المسببات المرضية (Singh وآخرون، 2018) .

تمكن عدد من الباحثين بإنتاج العديد من المبيدات الحيوية المنتجة من الفطر *Trichoderma spp.* التي اثبتت كفاءتها العالية في حماية الكثير من النباتات من مسببات الامراض التي تصيبها وتحفيز نموها وغيرها . وفي العراق قد تميز عددا من هذه المبيدات الحيوية ومنها المبيد الاحيائي التريكوزون الذي اثبت ميدانياً كفاءته في تثبيط العديد من الامراض النباتية مثل مرض التعفن الفحمي على نبات البطيخ الناجم عن الفطر الممرض *M.phaseolina* (Ahmid و Ismail ، 2020) .

تعتمد غالبية منتجات *Trichoderma* في سوق المبيدات الحيوية على كونيدات هوائية منتجة في الأوساط الصلبة، وان هذه العملية يشيبها ضعف السيطرة على الجودة وتدهور حيوية المنتج والمخاوف البيئية للعمال. (Pandeyوآخرون،2008. Ramanujamوآخرون،2010). وفي

دراسات حديثة اعتمدت على انتاج الاجسام الحجرية من أنواع الفطر *Trichoderma*. ودعمها للمنتج ، التي تتميز بتحملها لظروف الجفاف والخزن لفترات طويله ،إذ تنتج الاجسام الحجرية من أي نوع أو سلالة من جنس الفطر *Trichoderma*. ومن الأنواع التي تمت تجربتها *T. harzianum*، *T. lignorum*، *T. viridae*، *Trichoderma reesei*، *T. asperellum*.(Jackson وآخرون،2017).

هدفت هذه الدراسة الى تصنيع مبيد حيوي من عزلات مختلفة للفطر *Trichoderma* spp مدعم بالاجسام الحجرية والسموم الفطرية المنتجة منها ، لمكافحة المسببات المرضية ومنها مسببات مرض تعفن البذور وموت بادرات القطن، وتقييم فعاليتها في استحثاث المقاومة الجهازية للنبات ضد المسببات المرضية .

2: مراجعة المصادر

2 -1: تصنيف الفطر الاحيائي *Trichoderma* spp.

تم تصنيف الفطر *Trichoderma* spp. سابقاً ضمن مجموعة تحت قسم الفطريات الناقصة (Deuteromycotina) ، اذ صنفه العالم Rifai عام 1969 ضمن الفطريات الناقصة وصف الفطريات Hyphomycetes ورتبة Moniliales وعائلة Moniliaceae ، ولكن بعد اكتشاف طوره الجنسي المتمثل بالجنس *Hypocrea* spp. ، صنف ضمن قسم الفطريات الكيسية Ascomycota وصف Sordariomycetes رتبة Hypocreales وعائلة Hypocreaceae جنس *Hypocrea* spp. (Alexopoulus وآخرون ، 1996) . اما السلم التصنيفي الحديث للفطر في المركز الدولي لبنك الفطريات (www.mycobank.org) .

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Class: Sordariomycetes

Subclass: Hypocreomycetidae

Order: Hypocreales

Family: Hypocreaceae

Genus: *Trichoderma* (Hypocrea)

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

إنّ مستعمرات الفطر تنمو بشكل سريع في البداية على الاوساط الزرعية وتكون ذا سطح ناعم ولون ابيض شفاف ، اذ يكون الثالوس شفافاً تقريباً ثم يصبحُ أبيضاً أو اخضراً مع تقدم عمر المستعمرة الفطرية كذلك وجود كتل زغبيه متناثرة ذات لون أخضر تتكون من الجراثيم و تكون بيضوية الشكل ، تتبعه هايفات هوائية تتطور عليها الابواغ الكونيدية التي تكون في البداية بيضاء مخضرة ثم تتحول إلى خضراء براقة ثم تصبح اشد خضرة الهايفات مقسمة ومتفرعة ذات سطح املس عديمة اللون قطرها يتراوح بين 1.5-3.0 مايكرون الحوامل الكونيدية الرئيسة قطرها 4.5 مايكرون وتنتج حواملاً جانبية عديدة هذه التفرعات قد تكون مفردة ولكن في الاغلب تكون بشكل مجموعات (Rifai، 1969). وللمستعمرة رائحة تشبه رائحة جوز الهند (علوان،2005).

2-2 المقاومة الاحيائية Biological Control

ان تعريف المقاومة الاحيائية حسب cookوbaker (1983) هو تقليل كمية اللقاح او نشاط انتاج المرض من الممرض بواسطة واحد او أكثر من الكائنات الحية، فمن الضروري السيطرة على امراض النبات من خلال التحكم في انتشار المسببات المرضية ونموها والأمراض التي تسببها للنبات من خلال وضع اليات واستراتيجيات معينة للحد من مسببات الامراض عن طريق التطفل الفطري المباشر او غير المباشر او التنافس او انتاج المضادات الحيوية (Vicente وآخرون ، 2012). كان استخدام عوامل المكافحة الاحيائية ضروريًا كبديل للاستخدام المكثف لمبيدات الآفات الكيميائية علاوة على ذلك فإن استخدام هذه العوامل بدلاً من مبيدات الآفات الكيميائية له مزايا أخرى خاصة للإدارة البيئية المستدامة والصحة العامة (Shrestha ، 2019) . تعتمد المكافحة الاحيائية على استخدام الطفيليات أو المفترسات أو مسببات الأمراض من أجل التحكم في نشاط الكائنات المسببة للأمراض الأخرى (Silva، 2019) .

3-2 استخدامات الفطر spp *Trichoderma* في المقاومة الحيوية :

تعد المكافحة الاحيائية بالمضادات الميكروبية طريقة بديلة للسيطرة على أمراض النبات وتعد أنواع .*Trichoderma* spp واحدة من اهم عوامل المكافحة الحيوية الفطرية المناسبة في قمع مسببات الأمراض التي تنقلها التربة (Zhang وآخرون ،2018) ، اذ يعود إلى جنس *Trichoderma* spp عدد كبير من السلالات الفطرية تعمل كعوامل تحكم بيولوجية ، اذ يعد جنس .*Trichoderma* spp من أهم الفطريات المستعملة في المكافحة الاحيائية لما له من قدرة على تثبيط الفطريات الممرضة للنبات وذلك باستخدام آليات مختلفة وهي التطفل الفطري والتنافس على

المكان والغذاء وإنتاج المواد المضادة للفطريات (Kaewchai، 2009 و سعاد، 2011). إذ تعتمد عملية المكافحة الحيوية في سلالات *Trichoderma* على النبات المحصول والظروف البيئية وتوفر الغذاء ودرجة الحموضة ودرجة الحرارة وتركيز الحديد(International Microbiology،2004). اذ تحتوي منتجات *Trichoderma* spp. على مجموعة متنوعة من الاستخدامات في مجالات البيئة والصحة وحتى الصناعة وغيرها (Woo و وآخرون 2014 و Silva ، 2019) ودورها بالارتباط التكافلي مع النباتات ادى إلى اكتساب مقاومة النبات ضد مسببات امراض النبات ، وتحسين عمليات النمو للنباتات ويعزز امتصاص المغذيات وغيرها (Silletti وآخرون ، 2021) إذ يعد إنتاج المضادات الحيوية والمنافسة والتطفل الفطري ودعم وتعزيز نمو النباتات والتي يتضمن تحفيز كل عملية التخليق الحيوي للمستقلبات المستهدفة مثل منظمات نمو النبات والإنزيمات و Siderophores وغيرها من بين اهم السمات الرئيسة التي تتميز بها انواع الفطر *Thrichoderma* spp. (Shrestha ، 2019) وبالتالي منع أو إعاقة نمو المسببات المرضية والسيطرة عليها فإن الأدلة المقدمة في هذه الدراسة تدعم وبقوة إمكانية استخدام انواع الفطر *Thrichoderma* spp. كعوامل تحكم بيولوجي آمنة وصديقة للبيئة وفعالة لحماية المحاصيل الزراعية المختلفة . (Soodواخرون، 2020)

ان الفطر *Trichoderma* من خلال التطفل المباشر ومضاداته وتنافسه على الفضاء والمغذيات يعمل على منع نمو مسببات الأمراض و يؤثر إيجابيا على نمو النباتات ، بما في ذلك نظام الجذر الخاص بها ، والذي يعد تأثيرًا مرغوبًا أثناء فترات الجفاف ،وقد ثبت أيضًا أن الفطر*Trichoderma* يمكنه تحويل سموم الفيوزاريوم إلى مركبات ايض ثانوي جديدة يمكن أن تكون أقل سمية .(Modrzewskaوآخرون،2022). وعند الفحص الجزيئي على عينات من الفطر *Aspergillus flavus* عند استخدام الفطر *Trichoderma* في المكافحة الحيوية وجد ان الافلاتوكسينات المنتجة قلت اما بتثبيط نموها وانتاجها او تحويل سميتها إلى مركبات اقل سمية.(Renوآخرون،2022).

4-2 اليات المقاومة الحيوية للفطر *Trichoderma*:

1-4-2 التطفل الفطري

يستخدم الفطر *Trichoderma* عدة خطوات للقيام بالتطفل على الفطر الممرض فيقوم بالتعرف على الفطراولاً ثم النمو باتجاهه من جهة ومن جهة أخرى تحدث تغييرات مظهرية على

الغزل الفطري للفطر *Trichoderma* تكون على شكل لولبي لتشكل تراكيب ضاغطة تلتف حول الغزل الفطري للعائل منتجا مواد لاصقة كالكليسرول تساعد الفطر المتطفل الالتصاق على الفطر العائل(wooوآخرون،2006وMcintyreوآخرون،2004). وهنالك أنواع من الفطر *Trichoderma harazianum* تهاجم عن بعد باستخدام المواد المركزة التي تنتجها مثل الاستلديهايد وثاني أوكسيد الكربون CO_2 , NH_4. (Lo وآخرون 1998).

2-4-2 التضاد الفطري في الفطر ***Trichoderma***

للفطر *Trichoderma* قابلية تضاد عالية ضد المسببات المرضية على النبات وتثبيط تكوين الخيط الفطري وتكوين الاجسام الحجرية فقد اثبتت دراسة إمكانية الفطر *Trichoderma* على تثبيط نمو الفطر *Rhizoctonia solani* المتسبب في تعفن الجذور في الفراولة (Huواخرون،2022).وفي دراسة أجريت استخدم فيها الفطر *Trichoderma* كمضاد حيوي على مرض تعفن القرون في الكاكاو المتسبب عن الفطر *Moniliophthora roreri* ان للفطر قابلية عالية في ثبيط المسبب المرضي وخفض نسبة الإصابة في النبات (Leiva،2022).كما أجريت دراسة على نبات الافوكادو والعزلات الفطرية المسببة لامراض الافوكادووهي Neofusicoccum parvumو Colletotrichum gloeosporioidesو .Diaporthe sp، Phomopsis perseae حيث كان للفطر *Trichoderma* تأثير تضادي وتثبيط عالي ضد هذ المسببات (Lópezواخرون،2022).

2-4-3 التنافس:

يمتلك الفطر *Trichoderma* قابلية تنافسية عالية ضد المسببات المرضية وتحمل المواد السامة بما فيها المبيدات العشبية والفطرية ومبيد الحشرات DDT والمركبات الفينولية فضلا عن قدرته على استخدام مصادر مختلفة من السكريات المنتشرة في بيئة الفطر مثل cellulose, glucan, chitin (chet وآخرون،1997). وله القدرة على استعمار منطقة حول الجذور ومنافسته العالية للممرضات على المواد الغذائية وتقليل الإصابة الناتجة منها (sivan وchet ،1989).

2-4-4 قدرة الفطر *Trichoderma* على استحثاث المقاومة لدى النبات:

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

Trichoderma spp. مركبات تحفز آليات دفاعية في النبات لقدرته على تحفيز النمو وتحفيز المقاومة الجهازية في النبات (Andhare وآخرون، 2019) . وفي دراسة اجراها Lopez واخرون،2020 على سلالة للفطر *Trichoderma* قيم فيها إمكانية ال *Trichoderma* على تعزيز نمو النبات واستحثاث عوامل المقاومة لدى النبات ضد المسببات المرضية.

يتميز الفطر *Trichoderma* أيضا في قدرته على استحثاث المقاومة في النبات ضد المسببات المرضية من خلال تحفيز النبات على تصنيع مواد مثبطة لنمو المسببات المرضية فقد سجل زيادة في تركيز التربينات وانزيم البيروكسيد في بادرات القطن المعاملة بذوره بالفطر *Trichoderma virens*ضد الإصابة بالفطر *Rizoctonia Solani* (Howell وآخرون، 2000.).

2-4-5 تحور منطقة الجذر:

يُعد الاس الهيدروجيني للتربة من اهم العوامل التي تؤثر في فعالية الفطر *Trichoderma* وكذلك المواد الممرضة التي تفرزها الاحياء المجهرية الدقيقة إذ تتأثر الانزيمات المحللة للبروتين الحامضي وتتحطم بانخفاض الحامضية في حين تتحطم المضادات الحيوية بالحامضية العالية (Delgad وآخرون، 2000). وان الفطر *Trichoderma* له قدرة عالية على التكيف في الترب الحامضية وتثبيط الممرضات من خلال التحكم بالاس الهيدروجيني إذ ان التغير في الاس الهيدروجيني لا يؤثر في افرازات انزيمات الفطر (Mcintyre وآخرون،2004).

2-4-6 تأثير الفطر *Trichoderma* في نمو النبات:

اثبتت العديد من الدراسات أهمية الفطر *Trichoderma* في احداث زيادة في نمو النبات وانتاجه حيث يستطيع الفطر اختراق الجذور وتكوين تراكيب مشابهة للمايكورايزا ، لذلك تزداد كفاءة امتصاص العناصر الغذائية في النبات كالنتروجين والعناصر الغذائية ضعيفة الذوبان مثل الزنك والمنغنيز والحديد والنحاس وإنتاج مواد بيوكيماوية منفصلة تزيد من جاهزية تلك العناصر للنبات من خلال اختزالها ، حيث تعزز siderophores عزل الحديد مما يسهل امتصاصه بواسطة النباتات وعن طريق *Trichoderma* نفسها، مما يدل على دور رئيسي في المنافسة على هذا المعدن والمساهمة أيضا بزيادة جاهزية العناصر الغذائية للنبات من خلال تحليل المواد العضوية في منطقة حول الجذور وافراز منظمات نمو لها دور في تحفيز نمو النبات (Ankeو Laatsch ، 2018و Zapparata وآخرون (2021)

5-2 استعمالات الفطر *Trichoderma*

1-5-2 الاستعمالات الزراعية:

تم انتاج العديد من المستحضرات التجارية التي تحتوي على *الفطر* *Trichoderma SPP.* كمادة فعّالة أو جزء أساس من المستحضر متوفرة في الأسواق المحلية والعالمية اذ يوجد 50 منتجا تجارياً مسجلا عالمياً (2005,Fravel) كما يعمل الفطر *Trichoderma* على زيادة الانبات في البذور حيث يقوم بحماية البذور من الإصابة بالفطريات المرضية. (الجعيفري ،2006 وحسون2009).

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

2-5-2 الاستعمالات الصناعية:

يتم استعمال أنواع من الفطر *Trichoderma* في صناعات متعددة منها صناعة المشروبات الكحولية ويعود ذلك إلى فعالية ونشاط انزيمات pectinases (Blandinoوآخرون2001).كما تؤدي الانزيمات دورا متميزا في الصناعات الغذائية اذ ان انزيمات cellulases تعمل على إزالة الالياف من الزيوت واستخراج النشا من البطاطا كما يستعمل في تنقية الدقيق واستخلاص البروتينات من أوراق الحشائش وتطرية الفواكه والخضر قبل طبخها واستخلاص مكونات الشاي الأخضر وتحسين المواد الغذائية مثل الخضر وفول الصويا والرز لزيادة قيمتها الغذائية واستخلاص عصائر الخضراوات. (zhouوآخرون،2008).

ويستخدم انزيم protease في صناعة المنظفات كما يدخل في الصناعات الغذائية والاعلاف الحيوانية والصناعات النسيجية والورقية والصناعات الدوائية والعديد من الصناعات الكيميائية الأخرى(Bhat، 2000) وتستعمل انزيمات cellulase, pectinase, Lipase, في عمليات تنظيف القطن الخام وانزيمات Xidoreductase في عمليات التصبيغ (Arumugamواخرون،2005).

3-5-2 استخدام الفطر *Trichoderma* في التقانات الاحيائية:

تم استعمال العديد من أنواع الفطر *Trichoderma* في مجال نقل الجينات فقد تم فصل الحامض النووي cDNA من الفطر *Trichoderma reesei* للحصول على الجين المسؤول عن انتاج انزيم cellulases، endoglucanases عن طريق التعبير الجيني gene expression في الخمائر كما تم استعمال الفطر نفسه في فصل الجينات المسؤولة عن انتاج انزيم β -glucosidase من قبل الباحث Takashima).وآخرون.(1999)،.

وقام العالم (Yang وآخرون 2007,). بفصل الجينات المسؤولة عن تحفيز انزيمات منع التأكسد من الفطر *Trichoderma harazianum* إلى بكتريا E. coli. وتم فصل الجينات المسؤولة عن تحفيز انتاج انزيم 1,6-β endoglucanases من الفطر *Trichoderma reesei* إلى الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*.

4-5-2 التخليق الحيوي للجسيمات النانوية باستخدام جنس الترايكوديرما

تعد تقنية النانو الفطرية واحدة من أكثر الخيارات شيوعًا نظرًا للمجموعة الواسعة من الفوائد التي توفرها على البكتيريا والفطريات الشعاعية والنباتات والكائنات الحية الأخرى من حيث الصفات الفيزيائية والكيميائية (Abd-Elsalam، وآخرون2021) عندما يتعلق الأمر بالتوليد البيولوجي لـ NPs ، فإن الفطريات تتفوق في الأداء على غالبية الكائنات الحية الدقيقة من حيث الكفاءة. ويرجع ذلك إلى قدرة الفطريات على إنتاج مجموعة كبيرة ومتنوعة من مركبات الايض الثانوي النشطة بيولوجيًا وخصائص تراكم المعادن وتحسين العمليات، وكلها مفيدة (Zhaoوآخرون،2018). بسبب قدرتها على تحمل وتراكم المعادن في أنسجتها، ظهرت الفطريات كفرع مهم للتخليق الحيوي للجسيمات النانوية (Ayadوآخرون،2018). يُعدّ التخليق الأخضر للجسيمات النانوية غير سام لأنه ينطوي على استخدام الكواشف الآمنة، مما يجعلها أكثر فاعلية من حيث التكلفة وأساليب صديقة للبيئة مقارنة بالطرق التقليدية . توفر الفطريات العديد من العوامل

الأخرى، مثل سهولة الإدارة والزراعة، متطلبات المكونات المعقدة، إنتاج كمية كبيرة من الكتلة الحيوية والأيضات، قدرة عالية على ربط جدار الخلية، والقدرة على امتصاص كميات كبيرة من المعدن (Guilger-Casagrandeوآخرون،2019).

2-5-5 استخدام الفطر *Trichoderma* في التحطيم الحيوي للمبيدات الكيميائية

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

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

2-6 مركبات الايض الثانوي في الفطريات وتأثيرها في البيئة

تُعرف الفطريات بأنها واحدة من أكبر مصادر مركبات الايض الثانوي المتخصصة التي يطلق عليها نواتج الأيض الثانوية(2019,Chandra).وهي جزيئات غير متجانسة من الناحية الهيكلية منخفضة الاوزان الجزيئية ليست مطلوبة بشكل مباشر لضمان نمو الكائنات الحية التي تنتجها (Brakhage، 2013). إنها ليست ضرورية للبقاء على قيد الحياة في الظروف المثلى، ولكنها تعمل كإشارات كيميائية للتواصل، فهي تحدد الطريقة التي تتفاعل بها الفطريات مع البيئة،يتم تعديل إنتاج مركبات الايض الثانوي بشكل كبير من خلال التغيرات البيئية، ويتم تنشيط طرق التخليق

الحيوي المختلفة للتغلب على هذه التحديات داخل الخلية، تتفاعل مركبات الايض الثانوي مع البروتينات والأحماض النووية والأغشية ، مما يؤدي إلى استجابات جزيئية تمكن الفطريات من تغطية المتطلبات الفسيولوجية، من المعروف أن الحالة التغذوية، وتوافر النيتروجين والكربون والمعادن في الغالب ، ودرجة الحرارة ، ودرجة الحموضة ، والضوء ، وتوازن الأكسدة والاختزال تنظم تخليق الفطريات للأيض الثانوي (Wink وShimmer ، 2018 و Keller، 2019).

7-2 مركبات الايض الثانوي في الفطر *Trichoderma*

يمتلك الفطر *Trichoderma* القدرة على انتاج مركبات ايض ثانوي كالانزيمات والمضادات الميكروبية مما تجعل الفطر *Trichoderma* منافس قوي وفعال في المساحات والمواد الغذائية حيث تمكنه من استعمار المنافذ البيئية بسرعة مثل جذور النباتات (Saravanakumar، وآخرون 2016).ولمركبات الايض الثانوي في *Trichoderma* تأثيرات ضد المسببات المرضية كالفطريات والبكتريا والنيماتودا والفيروسات والحشرات(Alaniوآخرون ،2019 وKhan وآخرون ،2020). كذلك تعمل مركبات الايض الثانوي في *Trichoderma* كمؤثرات تؤدي إلى تغيرات مورفولوجية وفسيولوجية كبيرة في النبات العائل (Ramírez-Valdespinoواخرون،2019).مما يؤثر على نمو النبات وتغذيته ويعزز التحمل ضد الكائنات الحية (Contreras-Cornejo،2016).حيث ينتج الفطر *Trichoderma spp.* حامض اندول اسيتيك (IAA) وهو هرمون يعزز نمو النبات وتطوره (Contreras-Cornejo،2009). ويسهل تكيف العائل مع الاجهاد الملحي (Waqas وآخرون،2012).

كما يمكن أنْ تكون بعض مركبات الايض الثانوي هذه مستقلبات أدوية أو سمومًا أو كليهما فعلى سبيل المثال ، يعد السم Gliotoxin ، أول مضاد حيوي تم اكتشافه من فطر *Trichoderma* spp. كان يستخدم كدواء ضد العديد من المسببات المرضية (البكتريا والفطريات) (Mukherjee وآخرون 2013 و Silva، 2019) وبالوقت نفسه السموم الفطرية قادرة أيضا على احداث المرض والموت للانسان والحيوانات عند التعرض لها بجرعات كبيرة من خلال الابتلاع والاستنشاق اوالتعرض الجلدي كما سجلت مادة ال Dermodin بوصفها مضاداً حيوياً ينتجه الفطر *Trichoderma* spp. لمدى واسع من البكتريا والفطريات (Etzel، 2002) .

1-7-2 المضادات الحيوية

تنتج الاحياء المجهرية مركبات كنواتج لعمليات الايض الثانوي فيها وتتميز الفطريات بافراز مركبات ايض ثانوي قد يكون لها دور كبير في عمليات التضاد للمسببات المرضية الفطرية (Daoubi وآخرون،2009). ويعد الفطر *Trichoderma* الفطر الرائد في عملية المكافحة الحيوية ويعود ذلك لانتاج كميات كبيرة ومتعددة من مركبات الايض الثانوي سواء كانت سموم فطرية او مضادات حيوية.(Khanوآخرون،2020).

وبين Contreras وآخرون،(2016) إمكانية الفطر *Trichoderma spp* على النمو والاستحواذ على المنطقة القريبة من الجذور(الرايسوسفير) فتكون درعا مانعا يحيط بالجذور يمنع وصول المسببات المرضية إلى الجذور حيث يفرز مجموعة كبيرة من مركبات الايض الثانوي كالببتيدات غير رايبوسومية ، التربينويدات ، مركبات مشتقة من الاندوليك ،البيرونات) التي تعمل بدورها على زيادة تفرع الجذور. يقوم الفطر *Trichoderma spp* بتعزيز نمو النبات وتحفيز الاستجابات الدفاعية للنبات (Rai وآخرون ،2019) مما يسمح باستخدامه كعوامل مكافحة حيوية ضد المسببات المرضية ،وفي دراسة أخرى بين Bisenوآخرون،(2016) ان للفطر القابلية على انتاج مركبات منخفضة الوزن الجزيئي تقوم بتحفيز الاليات الدفاعية في النبات حيث يتحفز النبات لانتاج مركبات دفاعية كالكحول والفينولات لتثبيط المسببات المرضية.

وبين(Keswani وآخرون ،2019) بان المضادات الميكروبية التي تنتجها أنواع الفطر *Trichoderma* تعمل مضادات ضد مجموعة واسعة من مسببات الأمراض المرتبطة بالنبات والتي تنتمي إلى أجناس *Botrytis* و *Fusarium* و *Colletotrichum* و *Sclerotinia* و *Rhizoctonia* و *Pythium* و *Phytophthora* وغيرها.

2-7-2 السموم الفطرية

ان من ضمن المركبات الايضية التي تنتجها الفطريات هي السموم الفطرية، وهي مركبات تنتجها بعض الفطريات ، حيث تعمل بعض السموم الفطرية على تعطيل إشارات استشعار عند البكتريا ضد وجود الاحياء المجهرية المضادة ، مما يمنع إطلاق المركبات المضادة ضد الفطريات من قبل البكتيريا ، ولكن على العكس من ذلك ، يمكنها أيضًا تعزيز تكوين أغشية حيوية مختلطة تفضل جمع البكتريا والفطريات المفيدة (Venkatesh و Keller ، 2019). تسهم السموم الفطرية أيضًا في القدرة على إحداث الأمراض الفطرية والضراوة الامراضية كونها قادرة على تدمير أو

قمع دفاعات المضيف، مما يعزيز الاستعمار الناجح وتهيئة العوائل للعدوى (Suscaوآخرون، 2017). وبعض هذه السموم الفطرية تكون سموم فطرية متخصصة بعائل معين حيث تمتلك مركبات ببتيدية تؤثر بصورة خاصة في عائل محدد حيث يتطلب وجود بروتين متخصص في النبات العائل يكون سريع لاستقبال هذا الببتيد وبالتالي تهيئة العائل للعدوى بالمسبب المرضي (Collemare و Lebrun، 2011).

7-2-المضاد الحيوي Trichodermin

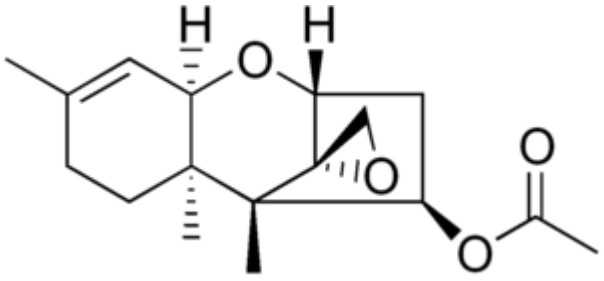
لقد تم الكشف عن Trichodermin لأول مره عام 1960 وتم تصويرة بشكل كامل بواسطة NMR و X-ray في راشح الفطر *T.viride* (Godtfreddesn و Vangedal، 1965) و تمت دراسة المسار الحيوي لتخليق هذ السم Trichodermin في *Trichoderma* spp حيث تم الكشف عن tri 5 gen المسؤول عن انتاج Trichodermin اذ ادت الزيادة في التعبير عنه إلى زيادة النشاط المضاد للفطريات في الفطر*T. bervicompactum* (Tijerino وآخرون ،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 وآخرون ، 1994 و Cardoza وآخرون ،2011) يعد 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)

كما يمتلك هذا السم القدرة على الا نتشار بسرعة عبر جدار الخلية ويرتبط بالرايبوسوم حقيقية النواة لمنع ترجمة البروتينات عن طريق التفاعل مع ناقل الببتيديل (Westerbergوآخرون ،1976) وفي دراسة سابقة اظهر المركب Trichodermin قدرة تضادية ضد الفطريات الخيطية والخمائر والبكتريا وفي دراسة اخرى من الناحية الاحيائية اظهر قدرة تضاد للملاريا وضد الفايروسات وكمبيدات للحشرات (Cole وCox ،2002و Garcia وآخرون 2002و Tijerino وآخرون ، 2011).

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 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، وآخرون ، 1988 و Nielsen وآخرون ،1998 ،2005 و Reino وآخرون ، 2008 و Yang وآخرون ، 2010 و Tijerino وآخرون ، 2011)

والسم Trichodermin هو المركب المضاد للفطريات الأكثر دراسة (Jin وآخرون 2007 و Degenkolb وآخرون ، 2008) اذ تم الحصول عليه من *T. brevicompactum* واظهر نشاط مثبط كبير للفطر *R. solani* و *B. cinerea* و *Colletotrichum lindemuthianum* (Shentu وآخرون ،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 وآخرون ، 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 ملغم \التر بينما حقق نسبة 54.2% على *Bursaphelenchus xylophilus* (Yangوآخرون ، 2010). في دراسة ساهم السم trichodermin المنتج من الفطر *Trichoderma viride* في علاج سرطان المبايض حيث كان trichodermin قادرًا على قمع سرطان المبيض ،فإن (0.5 ميكرومتر أو أكثر) من trichodermin قلل بشكل كبير من تكاثر خلايا سرطان المبيض (Cerami وآخرون،2012). وتركيبه الكيميائي شكل (1)

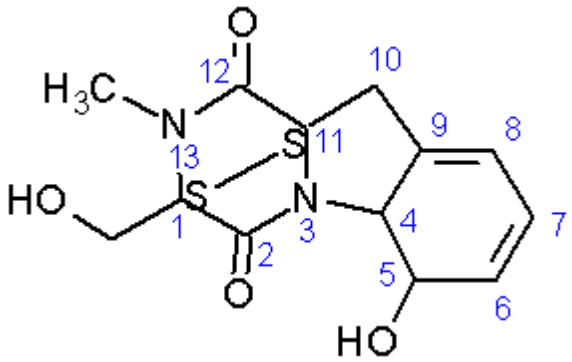


شكل (1) التركيب الكيميائي للمضاد الحيوي Trichodermin

4-7-2 **المضاد الحيوي Gliotoxin المنتج من قبل الفطر *Trichoderma* spp.**

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

يعد سم Gliotoxin مركباً نشطاً للغاية بواسطة التحليل الطيفي وهو أهم سم فطري من نوع Epithiodioxopiperazine(ETP)، تم عزل GT في الأصل من أنواع *Trichoderma* spp. كمضاد حيوي تشارك في المكافحة الاحيائية للفطريات المسببة للأمراض النباتية ، يُعرف GT منذ فترة طويلة بأنه عامل مثبط للمناعة ويقال أيضًا أن له خصائص مضادة للورم ومع ذلك ، تشير المنشورات الحديثة إلى أن Gliotoxin هو محدد ضراوة لمسببات امراض الانسان مثل *Aspergillus fumigatus* ، وهذا المركب مهم من جوانب كثيرة أبرزها خصائصه الطبيّة ومحدِّد إمراضية وعلامة تشخيصية محتملة ومهم في حماية المحاصيل الاحيائية. (Tomah وآخرون ، 2020، Sulaiman و Youns ، 2019) . شكل (2).



شكل (2) التركيب الكيميائي للمضاد الحيوي Gliotoxin

توصف مركبات السم Gliotoxin التي تم تحديدها على أنها ذات نشاط قوي مضاد للفيروسات يثبط فيروس الأنفلونزا A مما يشير إلى نشاط غير محدد واسع الطيف لهذا المركب، وقد تم

استخدام هذه المركبات سابقًا في جوانب مختلفة من العلاج المضاد للبكتيريا والفطريات وتشير النتائج الحالية إلى أنه على الرغم من أنها غير مناسبة للإدارة الداخلية ، إلا أنها قد تكون قابلةً للتطبيقات الموضعية المضادة للفيروسات ، أو كمطهرات وتوفر عناصر تحكم إيجابية ممتازة للدراسات المستقبلية . (Aljofan و وآخرون ، 2009)

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

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

8-2 التصنيع الحيوي لمستحضر الفطر *Trichoderma* spp

تمكن عدد من الباحثين مثل Harman وآخرون (2004) و Ruocco وآخرون (2009) و Montealegre وآخرون (2010) ، بإنتاج العديد من المبيدات الحيوية المنتجة من الفطر *Trichoderma spp.* التي اثبتت كفاءتها العالية في حماية الكثير من النباتات من مسببات الامراض وتحفيز نمو النبات وغيرها . كما أظهرت نتائج Ahmid و Ismail (2020) فاعلية المبيد الاحيائي التريكوزون ميدانياً في تثبيط العديد من الامراض النباتية مثل مرض التعفن الفحمي على نبات البطيخ الناجم عن الفطر الممرض *M.phaseolina*. و قد قارن Silvia (2021) في دراسة اجراها على المبيد الاحيائي المصنع من الفطر *Trichoderma asperellum* في السيطرة على مرض تعفن الساق على الحمضيات (Citrus maxima) التي تسببها *Botryodiplodia theobromae* إذ أظهرت النتائج أن المبيد الحيوي للفطر

Trichoderma كان له قدرة أعلى في قمع هجوم المسببات الممرضة الذي كان قادرًا على شفاء الجروح المتعفنة على السيقان المتأثرة بنسبة 41.95٪ و 26.74٪ على التوالي وكذلك في دراسة اخرى أظهرت النتائج ان المبيد الحيوي للفطر *Trichoderma* spp. أعطت أفضل تأثير في السيطرة على مرض اللفحة الورقية على الذرة الذي يسببه فطر *Helmintosporium turcicum*. (Wiranata و Tantiani, ،2021) .

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

2-8-1 الاوساط التخمرية والمواد الحاملة المستعملة في تنمية واكثار فطر المقاومة الاحيائية

أنَّ من الامور التي اثرت على الاستخدام الواسع لعوامل المكافحة الاحيائية التي كان لها دور كبير 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 ويُعدّ العالم wells واخرون (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 Paningbatam،1997 و سعد ، 2001 و المالكي ، 2002) وقد بينت الدراسات السابقة إلى ان القدرة التطفلية للفطر الاحيائي تختلف حسب نوع الوسط الغذائي (Mukerji وGarg ،1987) .

وهناك العديد من الاوساط العضوية التي نستخدمها للتكاثر الكتلي لـ *Trichoderma*. الفيرميكوليت- التركيبة القائمة على نخالة القمح، والتركيبة القائمة على الزيت، والتركيبة القائمة على نفايات الموز هي بعض الأمثلة المستخدمة للتطبيق الميداني. (Rayوآخرون،2022).

اثبتت دراسة قامت بها علوان(2005) اختبرت من خلالها عدة أوساط تخمرية صلبة (جريش الذرة الصفراء والرز وبذور زهرة الشمس ونوى التمر) واختبرت عدد من الزيوت كأوساط تحميل (زيت زهرة الشمس وزيت فول الصويا وزيت الذرة) وكان وسط جريش الذرة افضل وسط تخمري ووسط زيت فول الصويا افضل وسط تحميل لفترات زمنية طويلة استمرت لمدة سنة كاملة حيث لم يطرأ تغيير في تركيزابواغ الفطر طيلة فترة الخزن. 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 تلقيحه 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 ملائمة للفطر *T.harzianum* ، هو السماد العضوي (حمودي ، 1999 و المالكي ، 2002.)

2-8-2 أشكال تجهيز المستحضرات الاحيائية:

تجهز المبيدات الاحيائية بعدة اشكال فمنها السائلة ومنها الصلبة وقد قسمت إلى منتجات جافة (غبار تعفير ، مسحوق قابل للبل ، حبيبات) ومنتجات كعوالق (قواعد ماء وزيوت مستحلبة) وتشير المصادر إلى 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 لإبقاء 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 .

يجب ان تحتوي الكتلة الحية 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، يجب ان تكون لها القدرة على البقاء لمدة طويلة وتتحمل فترة خزن طويلة، لذا 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 اساس في تركيبها اما بشكل ابواغ كونيدية اوغزل فطري (Whipps ، 1997 و Fravel وآخرون ،1998)

2-8-3: الاجسام الحجرية التي تنتجها أنواع الفطر *Trichoderma* spp واستخدامها في المبيد الاحيائي

تعتمد غالبية منتجات *Trichoderma* في سوق المبيدات الاحيائية على كونيدات هوائية منتجة في الأوساط الصلبة وكان إنتاج كونيديا الفطر *Trichoderma* الهوائية باستخدام الاوساط الصلبة للتخمير على الحبوب المبللة الا ان هذه العملية تستغرق أسابيع للإنتاج والتجفيف وأوقات التخمير الطويلة وضعف السيطرة على الجودة والمخاوف البيئية للعمال وارتفاع تكاليف العمالة مما يؤدي بالتالي إلى زيادة تكاليف الإنتاج. (Pandeyوآخرون،2008، Ramanujam وآخرون،2010).في دراسة أمريكية حديثة (براءة اختراع) اعتمدت على انتاج الاجسام الحجرية من أنواع الفطر *Trichoderma*. والاجسام الحجرية هي عبارة عن اجسام صغيرة صلبة متحملة للجفاف والخزن لفترات طويله لحين استعمالها والتي تنتج من الفطر في مرحلة الاستراحة للفطر اذ تنتج الاجسام الحجرية من أي نوع أو سلالة أو مجموعة متنوعة من جنس الفطر *Trichoderma*. ومن الأنواع التي تمت تجربتها في هذه الدراسة *T. harzianum*، *T. lignorum*، *T. viridae*، *T. reesei*، *T. koningii*، *T. pseudokoningii*، *T. polysporum*، T. asperellum، T. asperellum(Jackson وآخرون،2017). كما وضح Koboriوآخرون(2015) ان لدقيق بذور القطن والذي يعد مصدر للنتروجين في الوسط السائل تأثير فعال لانتاج الاجسام الحجرية من الفطر *Trichoderma harzianum*،والتي استخدمت لتثبيط الفطر الممرض *Rhizoctonia solani*

او القضاء عليه والمتسبب في موت بادرات البطيخ، وبين ان الاجسام الحجرية الناتجة تتميز بفترة صلاحية عند الخزن في الظروف المبردة وغير المبردة.

وأجرى Lopesوآخرون(2020) دراسة على بذور سليمة ومجففة قام بتغليفها بالأجسام الحجرية والكونيديات المحضرة من الفطر *Trichoderma asperellum* والمغمورة في أوساط سائلة وحفظت في درجات حرارة مختلفة فقد اثبتت الاجسام الحجرية كفائتها في الحفاظ على البذور وحمايتها من الإصابة بالمسببات المرضية.

2-9 : مرض تعفن بذور وموت بادرات القطن

يمكن أن يكون للأمراض التي تسببها الفطريات التي تنتقل عن طريق التربة تأثير كبير على جميع المحاصيل تقريبًا، و كانت تلك التي تحدث في المرحلة المبكرة من نمو البادرات بمثابة محدد أساس على إنتاج القطن في جميع أنحاء العالم. (Goulartوآخرون،2016). وبشكل عام، يرتبط الضرر في هذه المرحلة من المحاصيل بانخفاض عدد الشتلات، وتعفن البذور قبل الانبات أو موت البادرات بعد الانبات(Bradley ،2021).

يُعرف القطن على نطاق واسع بأنه محصول اقتصادي رئيسي في جميع أنحاء العالم، كما أن أهميته الاجتماعية والاقتصادية، لا سيما في الدول النامية، مفهومة جيدًا، تعد إصابة بادرات القطن من أهم الأمراض التي تحد من إنتاج القطن الوبر والبذور (Refaiوآخرون،2022). وعند عزل المسببات المرضية من نبات قطن مصاب بمرض تعفن البذور وموت البادرات وجد ان العزلات المرضية هي من الاجناس *Rhizoctonia solani*، *F. moniliforme*، *Fusarium solani*، *Macrophomina phaseolina*، *Pythium sp*، *Sclerotium rolfsii*. (Mansour وآخرون،2020).

وأظهرت دراسة على بادرات القطن ظهور عدد من المسببات المرضية التي تسبب موت البادرات في القطن والمعزولة من جذور البادرات في التربة وهي *Rhizoctonia solani*، *Fusarium* spp، *Macrophomona phaseolina*، والتي أدت إلى موت اعداد كبيرة من النبات (Zaki وآخرون،2021). أوضح Matloob وآخرون(2021) في دراسة على تعفن القطن وموت البادرات المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* ان نسبة حدوث المرض في مناطق مختلفة كانت تتراوح من 40 -100% وشدة المرض كانت تصل إلى 75%، وكانت قدرة تثبيط الفطر من قبل *Trichoderma harzianum* عالية حيث وصل معدل التثبيط إلى 68.5%.

كما تمكن Dawoud وآخرون(2021) من الحصول على ثمانية عزلات من الفطر *Fusarium* spp من جذور بادرات القطن كان لها قدرة إمراضية عالية على صنفين من القطن تسبب موت البادرات على القطن. وفي دراسة على ثلاثة أصناف من القطن وفي منطقتين مختلفتين في مراحل مختلفة من نمو النبات تم عزل الفطر *Alternaria alternata* من بادرات القطن في منطقة الرايزوسفير في التربة، كما اثبتوا عدم التواجد في المناطق غير مزروعة بمحصول القطن لم يتم العثور على الفطر كما لم يتواجد الفطر في غير منطقة الرايزوسفير(Singhوآخرون،2022).

2-10: مكافحة مرض تعفن بذور وموت بادرات القطن باستخدام أنواع من الفطر *Trichoderma* spp

تسبب أمراض النبات خسائر فادحة في الإنتاج الزراعي وتؤثر بشكل مباشر على اقتصاد العديد من البلدان اذ انخفض انتاج المحاصيل بشكل كبير متأثرة بمسببات الأمراض التي تنقلها التربة (Asad،2022). ويعد مرض تعفن البذور وموت البادرات في القطن من الامراض الخطيرة التي تسبب مشكلة عالمية في فقد كميات كبيرة للمحاصيل عندما لا يتم السيطرة عليه (Mohamed و Akladious ,2017).وبالتالي يستدعي اتخاذ تدابير مكافحة فورية لضمان الإنتاج المستدام للمحاصيل والأمن الغذائي لسد حاجة السكان (Ambricoوآخرون، 2020).

وبما ان استخدام المبيدات الفطرية تؤثر سلبًا على خصوبة التربة والكائنات الحية الدقيقة والكائنات الحية الأخرى الموجودة في التربة مثل ديدان الأرض وحتى البكتيريا الاحيائية المثبتة للنيتروجين، كما تسبب تلوث التربة والمياه الجوفية ولها مخاطر على الشخص الذي يستعمل مبيد الفطريات، وعلاوة على ذلك، فإن استخدام مبيدات الفطريات أدى إلى تطوير سلالات مرضية مقاومة لمبيدات الفطريات (Rani وآخرون 2017). وعند استخدام الفطر *T. virens* والفطر T. *koningii* على نبات قطن مصاب بمرض تعفن البذور وموت البادرات فقد كانت نسبة القتل في البذور وعدم الانبات للمسببات المرضية *R. oryzae*، *Pythium* sp.، P. *aphanidermatum*، *P. ultimum* (93% ، 47% ، 73%، 93%)على التوالي وجد ان تأثير الفطرين *T. virens*،*T. koningii* (87 %، 93%)على التوالي.(Howell ،2002).

11-2 : توليفة من عزلات الفطر *Trichoderma* وتأثيرها على الفطريات الممرضة .

اثبتت الكثير من الدراسات وجود حالات تضاد حيوي بين العوامل الاحيائية نفسها المستخدمة في المكافحة الاحيائية ضد الممرضات النباتية فقد اثبت تحسين خصائص النبات بشكل ملحوظ أثناء عند إضافة عامل المكافحة الاحيائية *T. viride* الى عامل المكافحة الاحيائية *T. harzianum* واعطى نتائجاً إيجابية في السيطرة على مسببات الأمراض الفطرية *F. solani* و *F. lateritium* *Rhizoctonia* sp (Alwan و وآخرون ،2012). و في دراسة اخرى اثبت أن استخدام اختبارات الزراعة المزدوجة بين *Botrytis. cinerea* وعزلات العوامل الحيوية *T.harzianum* و *T. viride* أظهرت أن تأثير معظم العزلات عملت على تثبيط المسبب المرضي، كما أوضحت النتائج أن المواد المتطايرة للعزلات من *T. harzianum* و *T. viride* نفسها حققت أعلى معدل تثبيط ضد *B. cinerea* بلغ 77٪ ، أظهر أيضًا أن عوامل المكافحة الاحيائية *T. harzianum* و *T. viride* قد حققت انخفاضًا في معدل الإصابة وشدة الإصابة بالفطريات الممرضة الاخرى (Al-Esawee و AL-Taae ، 2016) وقد أجريت دراسة لتقييم كفاءة نوعين من *T.harzianum* و *T.viride* واثنين من عزلات فطر *Glomus moseae* (G1 و G2) ومزيجهم في تعزيز نمو شتلات الطماطة وأظهرت النتائج أن جميع معاملات العوامل الاحيائية أدت إلى انخفاض معنوي في الفترة المطلوبة لبزوغ البادرات مقارنة بمعاملة السيطرة وزيادة نسبة ظهور الشتلات لكن العزلة *T. harzianu* + *G1*، *T. harzianum* + *G2* كانت الأفضل وأظهرت النتائج أيضًا أن جميع العوامل الاحيائية وتوليفاتها أدت إلى زيادة معنوية في معظم معاملات نمو النبات (عبد السادة وآخرون ،2012).ان كل نوع من أنواع الفطر يؤثر على عدد من الفطريات الممرضة اذ يستخدم الفطر *T. viride*, *T. harzianum koningii*, في المكافحة الحيوية ضد الفطريات *Rhizoctonia solani* و *Alternaria alternaria* على الرز، والفطر *Fusarium* spp و *T. longibrachiatum* و *T. harzianum* على الفطريات الممرضة *A.* solani و Sclerotium rolfsii على الطماطة، والفطر *T.* viride و *T.* reesei ضد الفطريات *A. porri* و *A. alternaria* و *C. circinans* على البصل، والفطر *T. hamatum* و *T. lignorum* و *T. viride* ، والفطر *T. harzianum* ضد الممرضات النباتية Ustiligo segatum, Tilletia indica على الحنطة ، والفطر *T. harzianum* ضد *Penicillium notatum* و *R. solani* و *A. alternaria* على الذرة. (Ray وآخرون،2022).

12-2 : استخدام التقانات الجزيئية في تشخيص الفطريات

تعتبر التقانات الجزيئية إحدى التقنيات المعتمدة وتكون تطبيقاتها واسعة الاستخدام في علم الاحياء الجزيئي إذ إن التفاعل التنظيمي مختبريا يعمل على تضاعف جزء معين من DNA وباختلاف كمياته إذ 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 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 وآخرون ، 2006.) استخدمت منطقة ITS في دراسات التصنيف الجيني، وهي سلسلة من القواعد النيتروجينية على الحمض النووي الريبوزي للجين rDNA. اذ تلعب هذه المنطقة دورًا مهمًا في تطوير وظيفة rDNA (lwen وآخرون، 2002)

تم اعتماد التباين في تسلسل المناطق 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، 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 وآخرون، 2012) وفي دراسة أجريت في بولندا لتقييم التنوع الجغرافي لفطر *Trichoderma* spp اذ استخدم 170 عزلة اخذت 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 دقيق للأنواع المختلفة لجنس *Trichoderma spp* (Blaszczyket و Orawiec ، 2011).

13-2 قواعد البيانات الاحيائيةNational Center for Biotechnology Information (NCBI) وبرنامج (BLAST) Basic Local Alignment Search Tool

اصبحت قواعد البيانات الاحيائية اكثر تطوراً لتمثل مكتبات للبيانات علوم الحياة الجينية، فأصبحت هناك مصادر متعددة لهذه البيانات منها البحوث المنشورة والتجارب العلمية والتقنيات المتقدمة ، اذ يعد GenBank من اكبر واهم قواعد البيانات الاحيائية المتوفرة، الذي يمتلك تتابع الحامض النووي المتاح للأبحاث على مختلف الكائنات الحية المعلومات والبيانات في Gen Bank يتم تحديثها كل 15 شهراً (Sanders وMiller ، 2010) و يتم تزويد بنك الجينات بالبيانات للقواعد النيتروجينية ،تتم عملية تعاون بين مراكز دولية تعود إلى دول مختلفة تشمل (NCBI) ومختبر علم الاحياء الجزئي الاوربي (EMBL) وبنك البيانات للحامض النووي اليابان (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 أحد الادوات التي يتم من خلالها البحث عن قواعد البيانات الواسعة المتاحة مثل Gen Bank الذي يعطي مقارنة بين العزلات المطلوبة والعزلات المتشابهة معها (NCBI) كما يعد من البرامج البحثية الخاصة بتطبيقات قواعد البيانات في معادلات خوارزمية تمثل تعاقب الحامض النووي (Benson ،2005).

14-2 : الشجرة الوراثية Phylogenetic Tree واستخدامها في الكشف الجزيئي عن العلاقة الوراثية بين العزلات الفطرية

الشجرة التطورية او ما تسمى بشجرة القرابة Phylogenetic 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 بأقصى قدر من الاحتمالية (Tumura وآخرون ، 2013) .

3: المواد وطرائق العمل Materials and Methods

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

استخدمت في هذه الدراسة مجموعة من الاجهزة والادوات المختلفة الخاصة بهذه الدراسة(جدول1) . و المواد الكيميائية (جدول 2) لتنفيذ الدراسة المختبرية . بينما استخدمت أوساط زرعية مختلفة لعزل الفطريات وتنميتها وتشخيصها (جدول3) وكذلك لغرض أجراء التجارب الخاصة بها . اذ عزل مجموعة كبيرة منها الفطريات المستخدمة في تنفيذ التجارب (جدول 4).

جدول 1: الأجهزة والادوات المستخدمة في أجراء التجارب في هذه الدراسة

ت	الجهاز	الشركة المصنعة	المنشا
1	الحاضنة (Incubator)	Memmert	Germany
2	المؤصدة (Autoclave)	LabTech	Germany
3	ثلاجة (Refrigerator)	L.G	Korea
4	مجهر ضوئي مركب (Compound light Microscope)	Olympus	Japan
5	ميزان حساس (balance Analytical)	Sartorius	U.K.
6	انابيب اختبار (Test tubes)	Sigma	England
7	اطباق بتري (Petri-Dishes)	----	Thailand
8	دوارق زجاجية مختلفة الاحجام (Flasks)	Unisonic LTD	England
9	اوراق ترشيح (Filter Papers)	Whatman	England
10	شرائح زجاجية (Slides and cover slide)	Whatman 4	England
11	محقنة طبية (Medical Syringe)	----	England
12	غرفة عزل (Isolation room)	LabTech	South Korea
13	جهاز تقطير(Distillation)	Heidolph	Germany
14	جهاز هزاز (Vortex)	Heidolph	Germany
15	اصص بلاستيكية(Anvil)	---	China
16	Millipore Fillter	Sartorius Stedim	Germany
17	الفرن الكهربائي(Electrical oven)		Germany
18	جهاز HPLC	---	Japan
20	جهاز الطرد المركزي Centrifuge Cooling	HettichEBA.20	Germany

Germany	Lap	Cylinder اسطونة	21
China		عدة تشريح(dissection kit)	22
China	Mammanlex	مطحنة كهربائية(Electric grinder)	23
France	---	جهاز المطياف الضوئي (spectrophotometry)	24
Japan	Ogawa seikico	جهاز قياس درجة الاس الهيدروجيني (pH-meter)	25
---	---	Loop	26
Germany	---	ثاقب فليني (Cork Borer)	27

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

المنشا	الشركة المصنعة	المواد الكيميائية	ت
India	Himedia	اكار(Agar)	1
Iraq	الجود	كحول اثيلي (Ethanol)	2
Iraq	Samara	مضاد حيوي Amoxicillin	3
Iraq	Samara	مضاد حيوي Chloramphinicol	4
INDIA		مضاد حيوي Tetracyclin	5
INDIA	HIMEDIA	كلوروفورمchloroform	6
INDIA	HIMEDIA	ميثانولmethanol	7
INDIA	HIMEDIA	خلات الاثيلethyl acetate	8
INDIA	HIMEDIA	دايكرومات البوتاسيوم potassium dichromate	9
England	BDH	حامض الكبريتيك المركز Concentrated sulfuric acid	10
England	BDH	سلفات الفضةsilver sulfate	11
England	BDH	حامض الفسفورphosphorous acid	12
INDIA	HIMEDIA	داي فينل امينDivinyl Amin	13
INDIA	HIMEDIA	سلفات الحديد iron sulfate	14

15	stander	Biobiopha	China
16	فورمالين Formalin	Fluka	Switzerland
17	Sodium Phosphate Buffer	HIMEDIA	INDIA
18	الكاتيكـــول Catechol	HIMEDIA	INDIA
19	Pyrogallol	BDH	England
20	بيروكسيد الهيدروجين H2O2	BDH	England
21	كاشف فولن Folin – Ciocalteau	BDH	England
22	كاربونـــات الصوديوم	HIMEDIA	INDIA
23	حامضGallic Acid	BDH	England

جدول 3: الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة .

ت	الوسط الزرعي	الشركة المصنعة	الغرض من استخدامه
1	وسط البطاطا دكستروز آكار Potato Dextrose Agar (P.D.A.)	India-Himedia	لعزل الفطريات وتنميتها وتشخيصها
2	وسط الآكار المائي Water Agar (W.A.)	حضر مختبريا	لمعرفة أمراضية الفطريات
3	وسط البطاطا سكروز السائل Potato Sucrose Broth (P.S.B.)	حضر مختبريا	للحصول على العالق الفطري
4	وسط البطاطا سكروز الصلب Potato Sucrose Agar (P.S.A.)	حضر مختبريا	لعزل الفطريات وتنميتها وتشخيصها
5	وسط الرز	حضر مختبريا	لتنمية الفطر
6	وسط الدخن	حضر مختبريا	لتنمية الممرضات
7	وسط جريش الذرة الصفراء	حضر مختبريا	لتنمية الفطر
8	وسط جزر بطاطا اكار	حضر مختبريا	لحفظ الفطر
9	وسط مستخلص الشعيرسكروز ببتون اكار	حضر مختبريا	لتنمية الفطر
10	وسط دقيق بذور القطن سكروزالسائل	حضر مختبريا	لتكوين اجسام حجرية
11	وسط جريش الذرة وفول الصويا	حضر مختبريا	للمستحضر الحيوي
12	وسط البتموس	عقم مختبريا	لحفظ العزلات المرضية

جدول 4: جميع الفطريات المستخدمة بالدراسة .

ت	الفطريات	مكان العزل او مكان الحصول عليه
1	عشرة عزلات من الفطر *Trichoderma* spp.	تم الحصول عليها من مختبر السموم الفطرية في كلية الزراعة من قبل (الدكتور ياسر ناصر حسين)
2	*Fusarium brachygibbosum*	من بذور وبادرات القطن المصاب
3	*Fusarium solan*	من بذور وبادرات القطن المصاب
4	*Alternaria alternata*	من بذور وبادرات القطن المصاب

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

استخدمت في هذه الدراسة أوساطاً زرعية مختلفة (جدول 3) لعزل الفطريات وتنميتها وتشخيصها وكذلك لغرض أجراء التجارب الخاصة بها وكما يأتي :

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

حضر الوسط بأخذ 200 غم من درنات البطاطا المقشرة والمقطعة إلى قطع صغيرة وغليها بالماء المقطر بحجم 500 مل لمدة 20 -30 دقيقة في دورق زجاجي وبعد إنتهاء مدّة الغليان رشح الخليط في دورق زجاجي بقطعة من الشاش للحصول على الراشح ، اذيب 10 غم من سكر السكروز و17 غم من الاكار في 500 مل اخرى ثم اضيف إليها راشح البطاطا واكمل الحجم إلى واحد لتر، 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 قبل وصول درجة الحرارة 45 مْ، ثم اضيف 250 ملغم / 1لتر من المضاد الحيوي Tetracyclin، وقبل التصلب تم صب الوسط في اطباق بتري حسب التجربة المطلوبة او حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

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

حضر بإذابة 39 غم في 1 لتر من الماء المقطر حسب تعليمات الشركة المصنعة ثم عقم بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدّة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 مْ وقبل التصلب اضيف إليه المضاد الحيوي

Tetracyclin، ثم صب الوسط في اطباق بتري حسب التجربة المطلوبة أو حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

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

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

3-2-4: وسط الرز .

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

3-2-5: وسط الدخن .

استعملت بذور الدخن المحلي (*Panicum miliacem*) وذلك بعد غسلها جيدا للتخلص من الاتربة و الشوائب و تنقيعها لست ساعات بالماء بعد التخلص من الماء الزائد منها بوضعها على قطعة من الشاش، وزعت باوزان متساوية في دوارق زجاجية حجم كل منها 250 مل بواقع 100غم لكل دورق و أغلقت بإحكام بعدها عقمت جميع الدوراق بواسطة المؤصدة في درجة حرارة 121 °م و ضغط 15 باوند/ انج^2 و لمدة 20 دقيقة ، وبعد انتهاء مدة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 م° وحفظت لحين الاستعمال (Dewan، 1989).

6-2-3: وسط جريش الذرة الصفراء .

حضر الوسط بعد الحصول على جريش الذرة عن طريق جرش حبوب الذرة الصفراء بواسطة طاحونة بعد تنقيتها من الشوائب ، تم ترطيبها بالماء المقطر المعقم ثم عقمت بجهاز المؤصدة بدرجة 121 °م و ضغط 15 باوند/ انج^2 ولمدة نصف ساعة ولمرتين ، وحفظت لحين الاستعمال(علوان،2005).

7-2-3 وسط البطاطا جزر اكار

حضر هذا الوسط بغلي 200 غم بطاطا و 200 غم من الجزر لكل لتر ماء لمدة 30 دقيقة وبعد ترشيح الخليط على قطعة شاش اضيف اليه 20 غم اكار ثم تم تعقيمه بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدّة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 م° ثم اضيف إليه المضاد الحيوي Tetracycline ثم صب الوسط في انابيب اختبار خاصة وبصورة مائلة لغرض حفظ العينات حسب التجربة المطلوبة و حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

8-2-3 : وسط البتموس

حضر هذا الوسط بجلب البتموس الجاهز وتم وضعه باكياس وتعقيمه بجهاز المؤصدة في درجة حرارة 121 °م و ضغط 15 باوند/ انج^2 و لمدة ساعة ليومين متتاليين ،بعدها تم تبريد الوسط وتوزيعه في انابيب اختبار حجم 20ملم بأحجام متساوية ولقحت الانابيب بالعزلات الفطرية المعزولة والتي تم تنقيتها مسبقا على وسط PDA ، ثم حفظت انابيب الاختبار بعد غلقها باحكام في الثلاجة لحين الحاجة لها.

9-2-3 وسط الشعيراكار ببتون

تم تحضير هذا الوسط بغسل بذور الشعير جيدا بالماء لإزالة الاتربة وجرش 100 غم منها ثم اضيف اليه 1 لتر من الماء المقطر وتم غليه لمدة 15 دقيقة وبعد انتهاء فترة الغليان رشح المستخلص عبر قطعة من الشاش في دورق زجاجي واضيف اليه 15غم من الاكار و5غم من الببتون ثم اكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر. تم تعقيمه بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدّة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 م°(Szulcواخرون،2017).

3-3 عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لتعفن البذور وموت بادرات القطن

1-3-3 زراعة بذور القطن

لغرض عزل الفطريات المسببة لتعفن البذور وموت بادرات القطن ، تم زراعة بذور القطن المحلي نوع المرسومي خلال شهر اذار ، في أربعة مناطق مختلفة من محافظة كربلاء المقدسة وهي منطقة الحسينية (كلية الزراعة) . منطقة الحسينية(الصلامية) ،منطقة البوبيات ، منطقة الحافظ (مشتل العتبة الحسينية المقدسة)) لحين انبات البذور وتكوين البادرات .

2-3-3 جمع العينات

بعد زراعة البذور وانباتها وظهور البادرات تم جمع العينات (جدول 5) البذور المتعفنة والبادرات الميتة قبل البزوغ وبعد البزوغ ووضعت في أكياس نايلون ونقلها إلى المختبر لاجراء الدراسة عليها ، حيث تم تنظيفها من الاتربة وغسلها جيدا بالماء المعقم وتجفيفها جيدا وحفظها في أكياس ورقية لامتصاص الرطوبة وحفظها في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م بعد تثبيت جميع البيانات من تاريخ الجمع ونوع العينة والمنطقة التي جمعت منها لاستخدامها في الدراسة .

جدول5 : نوع العينات وترميزها ومكان وتاريخ جمعها.

ت	رمز العينة	مكان جمع العينة	تأريخ جمع العينات	نوع العينة
1	K.h.1	كربلاء/الحافظ /مشتل العتبة الحسينية المقدسة	2021/11/15	بذور متعفنة
2	K.h.2	كربلاء/الحافظ /مشتل العتبة الحسينية المقدسة	2021/11/25	بادرات ميتة او مصابة
3	K.b.1	كربلاء/البوبيات	2021/11/15	بذور متعفنة
4	K.b.2	كربلاء/ البوبيات	2021/11/25	بادرات ميتة او مصابة
5	K.s.1	كربلاء / الصلامية	2021/11/15	بذور متعفنة
6	K.s.2	كربلاء / الصلامية	2021/11/25	بادرات ميتة او مصابة
7	K.a.1	كربلاء/كلية الزراعة	2021/11/15	بذور متعفنة
8	K.a.2	كربلاء/كلية الزراعة	2021/11/25	بادرات ميتة او مصابة

3-3-3 عزل الفطريات الممرضة من بذور وبادرات القطن المصابة

عزلت الفطريات من البذورالمتعفنة وبادرات القطن المصابة او الميتة قبل وبعد البزوغ ، اذ غسلت جيدا، تم عقمت سطحيا باستخدام هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2% لمدة دقيقتين ، بعدها غسلت جيدا بالماء المقطر المعقم لإزالة بقايا المحلول المعقم ثم ازيل الماء الزائد منها باستعمال ورق ترشيح معقم ، بعدها نقلت الاجزاء المعقمة بواسطة ملقط معقم إلى اطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي P.D.A وبواقع خمس بذرات او خمسة أجزاء من جذور البادرات المصابة لكل طبق وبواقع خمس مكررات ، حضنت الاطباق في درجة حرارة 25±2 م ° وبعد اربعة ايام تم فحص المستعمرات الفطرية النامية وفحصت تحت المجهر لغرض تشخيصها وحفظها (Lacey وآخرون.1999).

3-4: تنقية وتشخيص الفطريات المعزولة .

بعد عزل الفطريات من بذور القطن وبادراتها ، تم تنقيتها بطريقة البوغ المنفرد باستخدام طريقة التخطيط على عدد من الاطباق (Streak-plate method) او بطريقة طرف خيط الهايفه بواسطة أبره ذات حلقة دائرية (Loop) معقمة في أطباق بتري حاوية على الوسط الزرعي PDA المعقم ورمزت ورقمت ثم حضنت الاطباق في الحاضنة على درجة حرارة 25±2°م لمدة يومين بعدها تم اخذ المستعمرات النابتة منها ونقلت إلى اطباق جديدة حاوية على الوسط نفسه وحضنت لمدة خمسة أيام (Samson وآخرون، 2004) ، فحصت المستعمرات الفطرية التي ظهرت باستخدام المجهر الضوئي المركب ثم شخصت مظهرياً اعتمادا على الصفات المظهرية والمجهرية وبأتباع المفاتيح التصنيفية التي ذكرها كل من Leslie و Summerell (2006) و Pandian وآخرون (2016) و Dıaz-Najerag وآخرون، (2021) من قبل (أ.د. ياسر ناصر حسين الحميري) وبعدها تم حساب النسب المئوية للظهور (Occurence) للعزلات الفطرية و كذلك تم حساب النسبة المئوية لتردد عزلات الفطر الواحد بالعينات (Frequency). وفقا للمعادلات التالية :

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

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

3-5: حفظ العزلات الفطرية المعزولة .

حفظت عزلات الفطريات الممرضة المعزولة *Fusarium* sp. و *Rhizoctonia* sp. و*Pythium* sp وVerticillum sp و*Alternaria sp.* على وسط البطاطا P.D.A. المصبوب في انابيب أختبار زجاجية، وتم تعقيمها في المؤصدة بدرجة حرارة 121ºم وضغط 15 باوند/إنج^2 لمدة 20 دقيقة، بعد انتهاء التعقيم تركت الانابيب بشكل مائل حتى التصلب. لقحت الانابيب بقرص قطر 0.5 سم مأخوذ من العزلات الفطرية النقية النامية على وسط P.D.A. وبعمرسبعة أيام بواقع اربعة مكررات ، حضنت الانابيب في درجة حرارة 25ºم لمدة سبعة أيام ثم حفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4ºم لحين الاستعمال مع تجديدها كلما دعت الحاجة لذلك (Booth وآخرون،1988).

واخيرا تم حفظ العزلات الفطرية الاكثر ضراوة بعد اجراء اختبارات المقدرة الامراضية تم حفظها على وسط البتموس في انابيب اختبار زجاجية بعد تعقيمها لمرتين خلال 24 ساعة في جهاز التعقيم البخاري بدرجة حرارة 121ºم وضغط 15 باوند/إنج^2 لمدة 60 دقيقة وليومين ، وحفظت لحين استخدامها .

3-6:اختبارالمقدرة الامراضية لعزلات الفطر.*Fusarium* sp و *Rhizoctonia* sp. و *Pythium* sp. و *Alternaria* sp. و*Verticillum* sp. مختبرياً .

تم اجراء اختبار المقدرة الامراضية باستخدام بذور القطن على وسط البتموس بعد تعقيمه لمرتين خلال 24 ساعة في المؤصدة بدرجة حرارة 121ºم وضغط 15 باوند/إنج^2 لمدة 60 دقيقة ووضعه في اصص بلاستك قطر 15سم ومعقمة لخمس وعشرون عزلة فطرية تم عزلها وتنقيتها مسبقا ، سبعة عزلات من الفطر *Fusarium* sp. وعشر عزلات من الفطر *Rhizoctonia* sp. وخمس عزلات من الفطر *Pythium* sp. وعزلتين من الفطر *Alternaria* sp. وعزلة من الفطر *Verticillum* sp وذلك لتقليص عددها واختيار الاكثر ضراوة منها واستخدامها بالاختبارات والتجارب الحقلية اللاحقة .

تم تحضير اصص حاوية على وسط البتموس المعقم ومن ثم تلقيحها بـعزلات الفطرية (خمس وعشرون عزلة فطرية) بشكل منفرد وذلك من مزارع فطرية نقية بعمر سبعة أيام وبثلاثة مكررات لكل منها ، وبواسطة ثاقب فليني قطرة 0.5 سم يتم وضعها في الاصص وخلطها بالتموس ثم حضنت الأصص في درجة حرارة 25+- 2ºم في غرفة الانبات وبعد 72 ساعة زرعت الاصص ببذور القطن (صنف محلي مرسومي) بعد تعقيم البذور بهايبوكلورات الصوديوم بتركيز

2% من المحلول التجاري الفاست لمدة دقيقتين بعدها غسلت جيدا بالماء المقطر المعقم ، وجففت بوضعها على ورقة ترشيح معقمة بعدها نقلت بواسطة ملقط معقم إلى الاصص البلاستك وبواقع 10 بذور في كل اصيص وبشكل دائري ووضعت في غرفة الانبات على درجة 25± 2°م ، (Christensen وآخرون 1988) .وبعد سبعة أيام حسبت النسبة المئوية للأنبات والبذور المتعفنة والنسبة المئوية للتثبيط باستخدام المعادلات الاتية :

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

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

3-7 التشخيص الجزيئي لعزلات الفطريات الأكثر امراضية على نبات القطن

تم التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية الأكثر امراضية بذور وموت بادرات القطن قيد الدراسة ، وهي 3 عزلات فطرية (جدول 6) التي شخصت مظهريا وبشكل مبدئي . تم التشخيص الجزيئي لهذه العزلات عن طريق تحليل تسلسل قواعد الحامض النووي لمنطقة ITS ومقارنتها بالعزلات المشخصة مسبقا . بعد ارسالها إلى شركة Macrogen الكورية الجنوبية لغرض تحديد التتابع النيوكلوتيدي.

وبعد استلام التتابعات النيوكلوتيدية للعزلات الفطرية حللت التتابعات النيوكلوتيدية بأستخدام برنامج BLAST(Basic Local Aligment Search Tool) ، لمقارنتها مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) National Center For (Biotecnology Information) ضمن بنك الجينات Gen Bank التي تعود لنفس العزلات الفطرية التي تم تشخيصها عالميا. وسجلت العزلات الفطرية التي لم تطابق اي من التتابعات النيوكلوتيدية 100% في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) . كما اجريت تحاليل القرابة الوراثية باستعمال برنامج MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) لتحليل العزلات ورسم شجرة القرابة بين كل من هذه العزلات والعزلات المشابهة لها المسجلة بمركز (NCBI) (ضمت شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم

الجوار Neighbor joining التي تم بناؤها من التسلسل الجزيئي النيوكليوتيدي لمنطقة ITS العائدة لكل من العزلات .

جدول 6 : ترميز عزلات الفطريات التي اظهرت مقدرة امراضية عالية وتم ارسالها إلى شركة Macrogen الكورية الجنوبية للتشخيص الجزيئي .

ت	العزلة الفطرية	العينة التي جمعت منها	رمز ID الارسال
1	*Alternaria sp.* (M)	كربلاء/ كلية الزراعة (Ka2)	A.J.M
2	*Fusarium sp.* (F2)	كربلاء / البوبيات(Kb2)	A.J.F2
3	*Fusarium sp.* (R1)	كربلاء / الصلامية (Ks1)	A.J.R1

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

تم تحضير اللقاح الفطري الخاص بالعزلات الفطرية الممرضة ، تم تجهيز وسط بذور الدخن *Panicum miliaceum* لتحميل لقاح العزلات الفطرية والذي تم تحضيره حسب الطريقة المذكورة في الفقرة 3_2_5 ، اذ لقحت الدوارق بالعزلات الفطرية كل على انفراد ، بواقع عشرة أقراص قطر كل منها 0.5 سم لكل دورق ، أخذت من حافة مزرعة الفطر بعمر سبعة أيام باستخدام ثاقب فليني معقم حضنت البذور المعاملة بالفطر لمدة خمسة عشر يوماً على درجة حرارة 25 ± 2 مْ اخذين بالحسبان تحريك البذور يوميا لضمان توزيع الفطر على جميع البذور إلى أن أصبحت جميع البذور مغطاة بشكل كامل بنموات الفطر الممرض .

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

تم اختبار المقدرة التضادية لعشر عزلات فطرية تابعة للفطر *Trichoderma* spp. تم الحصول عليها من دراسات سابقة ، بعد اثبات قدرتها التضادية ضد مجموعة من الفطريات الممرضة، اذ تم اختبارها ضد العزلات الفطرية الممرضة المسببة لامراض تعفن البذور وموت بادرات القطن وهي .*Fusarium brachygibbosum* و*Fusarium solani* و *Alternaria alternata*وبطريقة الزرع المزدوج (Baker وCook ، 1983) اذ قسم طبق بتري قطره 9 سم حاوي على الوسط الزرعي PDA إلى قسمين متساويين، ولقح مركز القسم الأول من الطبق بلقاح الفطر الممرض اذ اخذ قرص قطره 0.5 سم من مزرعة الفطر بعمر سبعة أيام ، بينما لقح مركز

القسم الأخر من الطبق بقرص قطره 0.5 سم من مزرعة الفطر *Trichoderma* spp. وبعمر سبعة أيام ، نفذت التجربة بواقع اربع مكررات وضعت الأطباق في حاضنة على درجة حرارة 25± 2ºم لمدة أسبوع واحد وقد تم تقدير المقدرة التضادية حسب مقياس (Bell وآخرون ، 1982) والمكون من خمس درجات :

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

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

3-10: اختبار التداخل بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp.

تم اجراء هذا الاختبار على ست عزلات فطرية للفطر *Trichoderma* spp. ، اثبتت مقدرتها التضادية ضد مسببات امراض تعفن البذور وموت بادرات القطن ، اذ اجري هذا الاختبار للكشف عن امكانية اتحاد اكثر من عزلة فطرية بدون اي مؤشرات تضاد حيوي فيما بينها ، انتخاب عدد من هذه العزلات لعمل المستحضر الحيوي النهائي من توليفة هذه العزلات ، وتقييم تأثيره التأزري ضد الفطريات المرضية .

تم الكشف عن قابلية التداخل بين العزلات الفطرية وبطريقة الزرع المزدوج اذ قسم طبق بتري قطره 9 سم حاوي على الوسط الزرعي MEA إلى ثلاثة اقسام متساوية ، ولقح مركز كل قسم من

الطبق بقرص قطره 0.5 سم من عزلة الفطر *Trichoderma* spp. وبعمر سبعة أيام (جدول 7). نفذت التجربة بواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة، وضعت الأطباق في حاضنة على درجة حرارة 25±1 م° لمدة أسبوع واحد وقد تم تقدير قابلية التداخل بوجود وعدم وجود مناطق التضاد بين العزلات .

جدول (7) اختبار التداخل بين 6 عزلات من الفطر *Trichoderma* spp.

ت	المعاملة	العزلة 1	العزلة 2	العزلة 3
1	المعاملة 1	***T.viride***	***T.pseudokoningii***	***T. reesei***
2	المعاملة 2	***T.viride***	***T.pseudokoningii***	***T.koningiopsis***
3	المعاملة 3	***T.viride***	***T.pseudokoningii***	***T. harzianum***
4	المعاملة 4	***T.viride***	***T.pseudokoningii***	***T. koningii***
5	المعاملة 5	***T.viride***	***T. reesei***	***T.koningiopsis***
6	المعاملة 6	***T.viride***	***T. reesei***	***T. harzianum***
7	المعاملة 7	***T.viride***	***T. reesei***	***T. koningii***
8	المعاملة 8	***T.viride***	***T.koningiopsis***	***T. harzianum***
9	المعاملة 9	***T.viride***	***T.koningiopsis***	***T. koningii***
10	المعاملة 10	***T.viride***	***T. harzianum***	***T. koningii***
11	المعاملة 11	***T.pseudokoningii***	***T. reesei***	***T.koningiopsis***
12	المعاملة 12	***T.pseudokoningii***	***T. reesei***	***T. harzianum***
13	المعاملة 13	***T.pseudokoningii***	***T. reesei***	***T. koningii***
14	المعاملة 14	***T.pseudokoningii***	***T.koningiopsis***	***T. harzianum***
15	المعاملة 15	***T.pseudokoningii***	***T.koningiopsis***	***T. koningii***
16	المعاملة 16	***T.pseudokoningii***	***T. harzianum***	***T. koningii***
17	المعاملة 17	***T. reesei***	***T.koningiopsis***	***T. harzianum***
18	المعاملة 18	***T. reesei***	***T.koningiopsis***	***T. koningii***
19	المعاملة 19	***T. reesei***	***T. harzianum***	***T. koningii***
20	المعاملة 20	***T.koningiopsis***	***T. harzianum***	***T. koningii***

*** كل معاملة اجريت بثلاث تكرارات**

11-3 الكشف عن قابلية عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma spp* المنتخبة على انتاج السمين الفطريين Trichodermin وGliotoxin

للكشف عن قابلية عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* spp. الاربعة المنتخبة مسبقاً ، على انتاج السمين الفطريين Trichodermin وGliotoxin ، تم تنمية هذه العزلات على وسط الرز والمحضر حسب الطريقة المذكورة في الفقرة 3-2-4 ، اذ تم وضع خمسة أقراص قطر كل منها 0.5 سم من فطر *Trichoderma* sp. في كل كيس يحوي 250 غم من الوسط ، أخذت من حافة مزرعة الفطر بعمر سبعة ايام حضن وسط الرز المعامل بالعزلات الفطرية لمدة 21 يوماً على درجة حرارة 25 ± 2 مْ ، مع تعريضها ظروف الاجهاد لتحفيزها على انتاج مركبات الايض الثانوي مثلا تعريضها إلى درجات حرارة منخفضة لمدة اربع دقائق اسبوعيا وكذلك تحريك الوسط كل يومين إلى ثلاثة أيام لضمان توزيع الفطر على جميع اجزاء الوسط .

تم اخذ 10 غم من الرز المنمى عليه الفطر *Trichoderma* sp. واضافته إلى 50 مل من الماء المقطر المعقم في دورق زجاجي وترك لمدة 24 ساعة مع التحريك المستمر ، اذ تم الاستعانة بالمازج المغناطيسي للمزج المتواصل ، بعد ذلك رشح الخليط باستخدام ورق ترشيح واضيف الى الراشح محلول الفصل المكون من ميثانول، كلوروفورم ، خلات الاثيل (3:2:1) بواقع 30مل/ للدورق ، رج جيدا وترك لمدة 24 ساعة بعدها عرض إلى عملية الطرد المركزي لمدة دقيقتين على سرعة 2000 دورة / دقيقة و اخذ الطافي بواسطة الماصة ونقل إلى انابيب خاصة معتمة وترك ليجف لعدة ايام ثم اذيب المستخلص بإضافة 2مل من الكحول المثيلي (Carberry وآخرون ، 2012) .

12-3: التقدير الكمي والنوعي للسمين Trichodermin و Gliotoxin باستخدام تقانة كروموتوكرافيا السائل فايق الأداء High Performance (HPLC) Liquid Chromatography

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

وحساب التركيز من خلال المعادلة الاتية :

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

13-3: القدرة التثبيطية للسمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin في نمو العزلات الفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA .

حضر الراشح الفطري الخاص بعزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma* sp. المنتخبة ، جهز وسط البطاطا سكروز السائل Potato Sucrose Broth (P.S.B) مختبريا ، وعقم الوسط في المؤصدة ترك لحين وصول درجة الحرارة 45 مْ وقبل التصلب ثم اضيف إليه المضاد الحيوي Chloramphinicol ثم وضع في انابيب اختبار بلاستيكية مغلقة سعة 50مل لقحت كل منها ب3 اقراص (0.5 سم) من كل العزلات الفطرية وبشكل منفرد ، اخذت من مستعمرات بعمر سبعة ايام تم تنميتها على وسط PDA وبواقع 3 انابيب/ عزلة فطرية ، بعد ذلك أغلقت وحضنت بدرجة حرارة 25 ± 2º لمدة خمسة عشر يوما.

بعدها رشح الوسط بواسطة ورقة ترشيح (whatman filter paper No.4) ، ثم أجريت عملية الطرد المركزي ،و خضع الراشح لعملية الطرد المركزي على سرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة خمس دقائق ، ثم رشح الرائق باستخدام مرشح دقيق (mellipore) قياس 0.22 ملي مايكرون (Konda , 2018). (تم اجراء الكشف التأكيدي لأنتاج السموم الفطرية كما في الفقرة 3-11). اضيف راشح كل عزلة فطرية بواقع 2 مل إلى 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 brachygibbosum* و*Fusarium solani* و*Alternaria alternata* كررت كل معاملة ثلاث مرات مع الاخذ بنظر الاعتبار وجود معاملة السيطرة التي كانت P.D.A. + 2مل ماء مقطر معقم فقط، وضعت المعاملات في الحاضنة ، على درجة حرارة 25 ± 2 مْ وبعد ان اكتمل نمو مقارنة كل عزلة فطرية ، تم قياس النسبة المئوية للتثبيط حسب المعادلة الاتية :

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{معدل قطر المستعمرة في السيطرة} - \text{معدل قطر المستعمرة في المعاملة}}{\text{معدل قطر المستعمرة في السيطرة}} \times 100$$

(Altindagواخرون،2006).

14-3 : الكشف عن قابلية عزلات الفطر . *Trichoderma spp* على تكوين الاجسام الحجرية ودعم المستحضر الحيوي بها .

تم الكشف عن قابلية عزلات الفطر .*Trichoderma* spp على تكوين الاجسام الحجرية ودعم المستحضر الحيوي بها .لتحملها للظروف البيئية القاسية وظروف الجفاف . نفذت الطريقة بتلقيح وسط زرعي سائل يحتوي على مصدر للكاربون و النيتروجين واضافة 3 اقراص من مستعمرة الفطر .*Trichoderma* spp بعمر 7 ايام ، اذ تضمن مصدر النيتروجين العضوي مسحوق بذور القطن بتراكيز يتراوح بين 8 غرام / لتر و 40 غرام / لتر ومصدر الكربون تضمن السكروز الذي يحتوي على تركيز اكثر من 40 غرام / لتر ، وحضن في حاضنة لفترة اكثر من 14 يوم على درجة حرارة 25 م لإنتاج الاجسام الحجرية الصغيرة وجمعها،حيث حضرهذا الوسط بتحضير 40غم و 8غم من دقيق بذور القطن بعد طحنها جيدا وتصفيتها من الشوائب و40غم من السكروز واضيف الماء المقطر إلى الخليط لاكمال 1 لتر وحرك جيدا لتجانس الخليط ونظمت درجة الحموضة (PH) إلى 6.5 وعقم الوسط في جهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121°م وضغط 15 باوند/إنج^2 لمدة 20 دقيقة (**Jacksonوآخرون،2017**). تم اجراء بعض الاختبارات على الاجسام الحجرية بعد عزلها وتنظيفها وتجفيفها وخزنها تحت ظروف الخزن الاعتيادية (درجة حرارة الغرفة) . اذ تم تقييم حيويتها شهريا ولمدة اربعة اشهر .

15-3 : تحضير المبيد الحيوي لعزلات الفطر .*Trichoderma* spp

حضر المبيد الحيوي الخاص بعزلات الفطر الاحيائي .*Trichoderma* spp . والذي اطلق عليه (FOUR.T) بتوليفة توافقية لأربع عزلات من الفطر الاحيائي وهي *T.viride*، *T.pseudokoningii*، *T.reesei* ، *T.koningiopsis* بعد اثبات كفاءتها التضادية ضد المسببات المرضية ، مقدرتها على انتاج الاجسام الحجرية (Micro sclerotia) على الوسط السائل، وانتاجها للسموم الفطرية Trichodermin وGliotoxin، وتدعيم المبيد الحيوي بهما . لزيادة فاعلية المبيد التضادية ضد المسببات المرضية ، وكفاءته الحيوية تحت ظروف الخزن والجفاف .

اذ حضر وسط جريش الذرة حسب الفقرة 3-2-6 ، ولقح الوسط بعزلات الفطر .*Trichoderma* spp بواقع عشرة أقراص من كل عزلة فطرية ، اخذت من عزلات عمرها

سبعة أيام بواسطة ثاقب فليني معقم (قطر 0.5سم) وحضنت لمدة 15 يوم بدرجة 25± 2 مْ ، وبعد تكوين الكونيديات بشكل جيد على جريش الذرة الصفراء ، تم تحفيز الخليط على انتاج السموم الفطرية وذلك بتعريضه إلى ظروف اجهاد مختلفة مثل تعريضه إلى درجات حرارة منخفظة(4 م°) ولفترات زمنية متفاوته لمدة سبعة ايام ، بعدها اضيف لها وسط التحميل والحفظ ، وهو زيت فول الصويا المعقم بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج^2 لمدة 20 دقيقة (مادة حاملة) حيث يضاف 250غم من جريش الذرة إلى 750مل من زيت الصويا بنسبة 3:1 غم من جريش الذرة : مل من زيت الصويا.وبعد 3 ايام اضيف 0.25 غم من الاجسام الحجرية (MS) المنتجة مسبقاً ، ليصبح المبيد الحيوي جاهزا للخزن والاستخدام .

16-3 : اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin والمبيد الحيوي (FOUR.T) ضد العزلات الفطرية الممرضة في الاصص البلاستيكية .

نفذت التجربة بوضع تربة مزيجية معقمة في المؤصدة وضعت في اصص بلاستيكية سعة 2 كغم ورطبت بالماء ، عوملت التربة بالمستحضرات الحيوية للفطر *Trichoderma* spp. بشكل مفرد ومتحدة والمنمى على جريش الذرة والتوليفة المتكاملة من العزلات الأربعة للفطر *Trichoderma* spp والمتمثلة بالمستحضر الحيوي ، وبوضع 10 غم (بشكل كلي) ولثلاثة مكررات لكل عينة قبل 7 ايام من زراعة بذور القطن المعقمة سطحيا 10 بذرة \ اصص ، وتم وضع الفطر الممرض (10غم) لكل اصيص المنمى على وسط الدخن ، قبل يومين من الزراعة (جدول: 8 والشكل:1) :

- تم قياس النسبة المئوية للاصابة بعد أسبوعين من الانبات وفق المعادلة الآتية:

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

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

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

الشكل(3): مراحل تنفيذ التجربة الحقلية لتقييم التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp والمبيد الحيوي (FOUR.T) ضد العزلات الفطرية الممرضة

جدول (8) معاملات تاثير التوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin ضد اي من العزلات الفطرية الممرضة حقلياً .

ت	المعاملات	كمية اللقاح المضافة	التفاصيل
1	المقارنة Control (بدون اي اضافة)	-----	بدون أي اضافة
2	اضافة الفطرالممرض فقط	10 غم من الممرض /كغم تربة	تم اضافته قبل يومين من زراعة البذور
3	الممرض + مستحضر الفطر(T.v) *T.viride*	10غم من المستحضر / كغم تربة	تم اضافه المستحضر الحيوي قبل 7ايام من زراعة البذور
4	الممرض + مستحضر الفطر (T.p) *T.pseudokoningii*	10غم من المستحضر / كغم تربة	تم اضافه المستحضر الحيوي قبل 7ايام من زراعة البذور
5	الممرض + مستحضر الفطر (T.ks) *T.koningiopsis*	10غم من المستحضر / كغم تربة	تم اضافه المستحضر الحيوي قبل 7ايام من زراعة البذور
6	الممرض + مستحضر الفطر (T.r) *T. reesei*	10غم من المستحضر / كغم تربة	تم اضافه المستحضر الحيوي قبل 7ايام من زراعة البذور
7	الممرض + مستحضر الفطرين (T.p) + (T.v)	10غم من خليط المستحضر / كغم تربة	تم اضافه المستحضر الحيوي قبل 7ايام من زراعة البذور
8	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.v)	10غم من خليط المستحضر / كغم تربة	تم اضافه المستحضر الحيوي قبل 7ايام من زراعة البذور
9	الممرض + مستحضر الفطرين (T.4) + (T.v)	10غم من خليط المستحضر / كغم تربة	تم اضافه المستحضر الحيوي قبل 7ايام من زراعة البذور
10	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.p)	10غم من خليط المستحضر / كغم تربة	تم اضافه المستحضر الحيوي قبل 7ايام من زراعة البذور
11	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.p)	10غم من خليط المستحضر / كغم تربة	تم اضافه المستحضر الحيوي قبل 7ايام من زراعة البذور
12	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.ks)	10غم من خليط المستحضر / كغم تربة	تم اضافه المستحضر الحيوي قبل 7ايام من زراعة البذور
13	الممرض + مستحضر الفطريات (T.ks) + (T.p) + (T.v)	10غم من خليط المستحضر / كغم تربة	تم اضافه المستحضر الحيوي قبل 7ايام من زراعة البذور
14	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.p) + (T.v)	10غم من خليط المستحضر / كغم تربة	تم اضافه المستحضر الحيوي قبل 7ايام من زراعة البذور
15	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.v)	10غم من خليط المستحضر / كغم تربة	تم اضافه المستحضر الحيوي قبل 7ايام من زراعة البذور
16	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.p)	10غم من خليط المستحضر / كغم تربة	تم اضافه المستحضر الحيوي قبل 7ايام من زراعة البذور
17	الممرض + المبيد الحيوي (FOUR.T)	10غم من المبيد (FOUR.T)/ كغم تربة	تم اضافه المستحضر الحيوي قبل 7ايام من زراعة البذور

كذلك تم حساب شدة الاصابة تبعاً للدليل المرضي الذي وضعة Wheeler وآخرون (1997) وكما يأتي:

0= بادرات سليمة .

1= بادرات حية ولكنها مصابة بتعفن الجذور.

2= موت بادرات بعد الظهور .

3= تعفن بذور وموت بادرات قبل الظهور.

3-17: اختبار دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. في استحثاث المقاومة الجهازية في بادرات القطن ضد ممرضات تعفن البذور وموت البادرات.

تم اجراء هذا الاختبار على عزلات الفطر *Trichoderma* spp. الاربعة المنتخبة وضمن التجربة الحقلية السابقة ، اذ عوملت بادرات القطن النابتة ضمن التجربة الحقلية ، بعد اسبوعين من الانبات بجرعة تعزيزية من معاملات الفطر *Trichoderma* spp. المختلفة . واخذت الاوراق الفتية بعد 7 ايام من هذه المعاملة لقياس بعض مؤشرات الاستحثاث .وكما يأتي:

3-17-1: قياس فعالية انزيم بولي فينيل اوكسيديز (PPO) Poly Phenol Oxidase .

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

1. خلط وسحق 1غم بشكل متجانس من أوراق بادرات القطن الفتية مع 20 مل من دارئ Sodium Phosphate Buffer بتركيز 0.1 مولاري و PH =6.5
2. وضع الخليط في جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 16000 دورة / دقيقة وبدرجة حرارة 4 مْ لمدة دقيقة ثم الترشيح للحصول على مستخلص الأنزيم .
3. اخذ200 مايكرولتر من المستخلص و اضيف إليه 1.5 مل من الدارئ الفوسفاتي Sodium Phosphate Buffer بتركيز 0.1 مولا ري و PH =7 وكذلك200 مايكرولتر من مادة الكاتيكول Catechol كمادة أساسية بتركيز 0.01 مولا ري وتحضن بدرجة حرارة 28±2 مْ .

4. تم قياس الامتصاصية للنموذج على طول موجي 495 نانو متر لكل مدة 30 ثانية وعلى مدى 3 دقائق بـعد ان يتم قراءة الامتصاصية على طول موجي 495 نانومتر.
5. وعبر عن فعالية الإنزيم بالتغير بالامتصاصية / دقيقة . غم وزن رطب اذ يتم حسـاب الـ PPO بتطبيق المعادلة ادناه :

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

* النشاط الانزيمي (وحدة امتصاص\غم وزن رطب)

3-17-2: قياس فعالية انزيم البيروكسيديز الـ (POD) Peroxidase .

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

1. خلط 1غم من النموذج مسحوق أوراق بادرات القطن وبشكل متجانس في 20 مل من الدارىء الفوسفاتي Sodium Phosphate Buffer بتركيز 0.1 مولاري وPH =7 .
2. رشح خلال اربع طبقات من قماش الشاش (موسلين)
3. وضع في جهاز الطرد المركزي المبرد بقوة 16000 دورة / الدقيقة لمدة 15 دقيقةً وبدرجة حرارة 4 مْ .
4. اهمل الراسب و أخذ الراشح (مستخلص الأنزيم) واضـيف اليه 1.5 مل من Pyrogallol كمادة أساس بتركيز 0.05 مولاري إلى 0.5 مل من المستخلص واضيف اليه أيضا 0.5 مل من H_2O_2 بتركيز 1% وتحضن بدرجة حرارة 25 ±2
5. تم قياس الامتصاصية للنموذج على طول موجي 420 نانومتر كل 30 ثانية لمدة 3 دقيقة يتم حسـاب الـ P.O.D بـعد قراءة الامتصاصية على طول موجي 420 نانومتر.
6. عبر عن الفعالية الإنزيمية كتغير في الكثافة الضوئية / دقيقة. غم وزن رطب وبتطبيق المعادلة:

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

* النشاط الانزيمي (وحدة امتصاص\غم وزن رطب)

3-17-3: قياس فعالية الفينول الكلي .

تم حساب فاعلية الفينول الكلي حسب طريقة Jakopic وveberic ، (2009) و Houssien ، (2010) وذلك حسب الخطوات الاتية :

1. أخذ 100ملغم من الوزن الطري لاوراق بادرات القطن في أنبوبة اختبار واضيف اليه 200 مل من الميثانول وضعت في حمام Ultrasonic bath لمدة 45 دقيقة للاستخلاص .
2. اخذت 100مايكرومتر من المســـــتخلص واضيفت اليه 5 مل من الماء المقطر مرتين و500مايكرومتر من كاشف فولن Folin – Ciocalteau .
3. ترك النموذج لمدة 30 ثانية وبعدها اضيف للنموذج 1.5 مل من محلول كاربونــــات الصوديوم بتركيز 20% W/v ثم ترك لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 40مْ
4. واخــــــذ 5 مل في خلية زجاجية وتم قياس الفينولات بجــــهاز المطياف الضوئي بطول موجي 765 نانومتر
5. حضر منحنى المعايرة (Calibration Curve) باستخدام سلسلة تركيز لحامض Gallic Acid .

3-18: تقدير الكلوروفيل الكلي (ملغم.غم$^{-1}$)

قدر محتوى الكلوروفيل الكلي في الاوراق الطرية ، إذ أخذ وزن 1غم من الاوراق الرطبة عشوائياً وسحقت بهاون السحق (الجفنة) بوجود الاسيتون 80% . ثم فصل الراشح بورق ترشيح بقمع بخنر . أخذ 1مل من الراشح مضافاً إليه 1مل أسيتون 80% لاكمال الحجم إلى 10 مل ، قيست العينات بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على الاطوال الموجية 660 و642.5 نانومتر حسب محتوى الكلوروفيل بمعادلة Lisiewska (2004) :

$$T.chl = [(7.12\times A660)+(16.8\times A642.5)] \times(V/W\times100)$$

T.chl= الكلوروفيل الكلي ، A=قراءة الجهاز ، W =وزن العينة (غم) ، V=حجم محلول الاستخلاص ، 642.5 و 660 = الاطوال الموجية المستخدمة بجهاز المطياف للقياس ، 7.12 و16.8= ثوابت رقمية.

18-3 : التصاميم الإحصائية للتجارب المختبرية والحقلية .

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

4: النتائج والمناقشة

4-1: عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لتعفن البذور وموت بادرات القطن .

بينت نتائج العزل والتشخيص لعينات بذور وبادرات القطن (جدول 9) التي ظهرت عليها أعراض اصابة مختلفة مثل تعفن البذور وذبول واصفرار وموت البادرات، وجود العديد من الفطريات المرضية للنبات .اذ سجل الفطر *Rhizoctonia* spp. اعلى نسبة ظهور حيث بلغت نسبة الظهور 75% ونسبة تردد بلغت28.57% فقد بينت الدراسات السابقة بان الفطر *R.solani* يعد واحداً من اهم المسببات المرضية لتعفن البذور وموت البادرات ، ويتواجد في كافة إنحاء العالم وبمدى عائلي قد يصل إلى أكثر من 500 نوع نباتي تنتمي لعوائل نباتية مختلفة و يصيب الفطر عوائل نباتية في جميع مراحل نموها فيصيب البذور والجذور و يسبب تعفنها كما أنه يسبب موت البادرات قبل البزوغ وبعده محدثا خسائر اقتصادية كبيرة ، فقد سجل على الخيار و الطماطة واللهإنة والبطاطا و الباميا و الباذنجإن و غيرها مسببا لها تعفن البذور و موت بادراتها (حسون، 2005 و Kareem و Hassan، 2013 و Foda وLoizou ، 2019) . يهاجم الفطر *R.solani* الأجزاء النباتية النامية تحت وفوق سطح التربة مثل البذور والجذور و البادرات و السيقان و الأوراق و البراعم و الثمار (العبيدي ،2019) تعد ظاهرة عدم إنبات البذور المصابة واحدة من اهم أعراض الاصابة ، وقد يسبب الفطر ظهور تقرحات على البادرات المصابة غير الميتة و بشكل تقرحات بنية غائرة محمرة على منطقة الساق المصابة و القريبة من سطح التربة (Ogoshi، 1996).

اما الفطر *Fusarium* spp فقد بلغت نسبة ظهوره 75% ، وبنسبة تردد بلغت 20% ، وان ظهور هذا الفطر يتفق مع دراسات سابقة ، فان الفطر *Fusarium* spp. يعد احد مسببات الأمراض النباتية المهمة التي تنتقل عن طريق التربة و له وجود واسع في جميع ترب العالم ومسؤول عن خسارة الانتاج كماً و نوعاً في العديد من المحاصيل المختلفة (Xia و آخرون 2018 وPunja و آخرون، 2018). وان للفطر قدرة عالية على مهاجمة جذور العديد من النباتات تحت سطح التربة واصابة السيقان و الاوراق و باعراض تظهر بهيئة تعفن في منطقة التاج و تلون بني في الحزم الوعائية و تبقع في الاوراق (Stack وآخرون 2017 و Shan وآخرون ،2017 و Eugenia وآخرون

،2019).وقد اشارت دراسة ان هذا الفطر يصيب العديد من المحاصيل في الصين وهي الذرة الصفراء والرز وفول الصويا مسببا امراضا خطيرة لها (Qiuوآخرون،2020). وفي دراسة أجرتها (الطوفان،2020) على الذرة الصفراء اثبتت ان الفطر *Fusarium* spp له اضرار واسعة على المحصول كتعفن العرانيص والساق والجذور والحبوب مع تكون السموم الفطرية التي يفرزها الفطر.

اما الفطر *Pythium spp* فقد ظهر في المرتبة الثالثة بنسبة ظهور50% وبنسبة تردد 20.8%. يعتبر الفطر*Pythium* spp من مسببات الأمراض المدمرة التي تسبب خسائر كبيرة في القطن وغيرها من المحاصيل ، إذ يسبب موت نبات القطن والبنجر السكري المتسبب عن الفطر *Pythium ultimum* وتعفن جذور الطماطة الناجم عن *Pythium aphanidermatum* (Chenوآخرون،2022).

كذلك تم عزل الفطر *Alternaria* spp وبنسبة ظهوربلغت 25% ونسبة تردد 8.3% ، لذا فإن الفطر *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 المحاصيل والخضروات (Rotem,1994,عبد الله ،2005) . ففي دراسة على أصناف مختلفة من القطن وفي مناطق مختلفة ، وفي مراحل مختلفة من نمو النبات تم عزل الفطر *Alternaria alternata* من بادرات القطن ومن منطقة الرايزوسفير في التربة (Singh وآخرون،2022). ومن الجدير بالذكر أن الإصابة بهذا الفطر قد تمتد إلى ألياف القطن حيث تم عزل الفطريات *Alternaria* sp و*Cladosporium herbarum* و *Fusarium sp* و*A. flavus* وغيرها من الياف القطن (Kappelmant، 1982)

وظهر الفطر *Verticillum* spp بنسبة ظهور 12.5 ونسبة تردد 2.85%، وقد بينت دراسات سابقة ان الفطر *Verticillum* spp من الممرضات الخطيرة على نباتات وبادرات القطن حيث يدخل عن طريق الجذور فيسبب ذبول النبات بسبب تراكمات السموم التي يطرحها وتراكم السكريات نتيجة تدمير الخلايا وفي دراسة بينت ان إصابة نباتات القطن بالفطر *Verticillum sp* أحد العوامل الرئيسة التي تحد من إنتاج محصول القطن (zhang وآخرون،2022)

جدول(9) : يوضح الفطريات المعزولة من البذور وبادرات القطن.

ت	اسم الفطر	عدد العزلات في العينات	النسبة المئوية للظهور%	النسبة المئوية للتردد%
1	***Rhizoctonia* spp.**	10	% 75	28.57
2	***Fusarium* spp.**	7	%75	20
3	***Pythium* spp.**	5	%50	20.8
4	***Alternaria* sp.**	2	%25	5.71
5	***Aspergillus* spp.**	3	37.5	8.57
6	***Penicillium* spp.**	3	37.5	8.57
7	***Rhizopus* spp**	2	25	5.71
8	***Macrophomina***	2	%25	5.71
9	***Verticillum* sp.**	1	%12.5	%2.85

2-4 : الوصف المظهري لاهم الفطريات المعزولة من البذور وبادرات القطن :

تبين ان الفطريات المعزولة تعود إلى انواع فطرية مختلفة نتيجة التباين بطبيعة نمو المستعمرات الفطرية وكثافة الغزل الفطري ولون المستعمرة والصبغات التي ينتجها الفطر بالوسط الزرعي (الشكل 2) والنامية على الوسط الغذائي .P.D.A بدرجة حرارة 25±2°م وبدون اضافة أي من المضادات الحيوية .

اذ تميزت عزلات الفطر *Rhizoctonia sp* بتكوينها مستعمرات بيضاء إلى كريمي في بداية النمو وعند تقدم المستعمرة بالعمر يتحول تدريجيا إلى اللون البني بسبب انتاجه إلى الاجسام الحجرية الكبيرة والصغيرة. وأظهرت تفرع الخيوط الفطرية للفطر *Rhizoctonia sp* حيث يظهر التفرع بزوايا قائمة ، مع وجود حاجز في نقطة اتصال الفرع بالخيط الفطري وتخصر واضح في نقطة الاتصال . وهذه الصفات مطابقة لما ذكرته دراسات سابقة (Chakrapani وآخرون،2022).

اما بالنسبة لطبيعة نمو مستعمرات الفطر *Fusarium solani* ففي بداية النمو يكون ذات لون ابيض إلى كريمي وفي الوسط محاط بحلقة بنية غامقة واطراف افتح ذات نمو قطني بينما اسفل الطبق يكون بني يتدرج إلى غامق ، ويحتوي على حوامل متفرعة

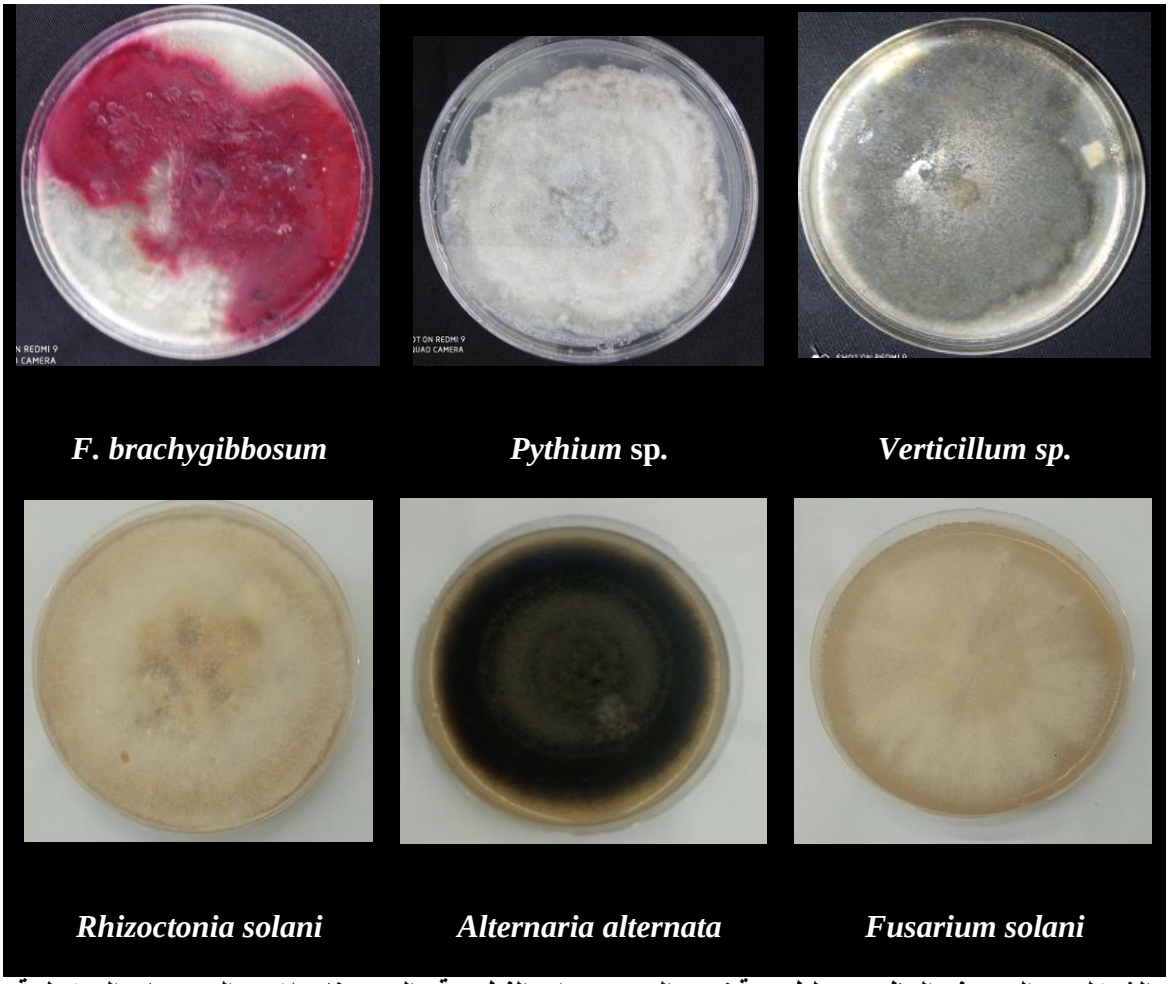
وغير متفرعة تحمل فاليدات طويلة وقليلة تحمل الكونيديات من نوع (macroconidia) متعددة الحواجز. اذ اشار Schroers وآخرون (2016). بان الخيوط الفطرية للفطر *Fusarium solani* تكون في البداية ذات لون ابيض إلى رمادي متفرعة او غير متفرعة والحوامل الكونيدية مخروطية الشكل تتكون بكثرة والفاليدات منتصبة تحمل كونيديات مدببة ومنحية من الطرف والابواغ شبه كروية ذات جدران خشنة (Chehriوآخرون،2015).

بينما تميز الفطر *Fusarium brachygibbosum* بانه يكون مستعمرات قطنية بيضاء في بداية النمو وسرعان ما تتحول إلى اللون الاحمر بصورة متساوية وكذلك التصبغات تكون ذات لون احمر غامق، كما تم وصفه من قبل Padwick 1945 فأنه يكوِّن مستعمرات ذات تصبغًا أحمر على الوسطPDA ، ان الفطر ينتج Macroconidia التي تكون منحنية قليلاً ، معظمها خمسة حواجز ملحوظة ، وخلايا مركزية عريضة ، وقمة حادة قليلاً ، وخلايا قاعدية ذات شكل يشبه القدم.(Shanوآخرون،2017).

كما ظهر الفطر *A.alternata* اذ يكون الفطر مستعمرة رمادية ومحاطة بحواف فاتحة والتي تتحول بتقدم العمر إلى مستعمرة ذات لون اسود او رمادي مسود، وتحت المجهر يلاحظ تكون حوامل كونيدية قصيرة مقسمة بنية اللون تحمل الأبواغ الكونيدية كمثرية مقسمة طوليا وعرضيا أو سلاسل ، وتكون تصبغات سوداء بالجهة الخلفية للطبق . ويعزى اللون الأسود إلى افراز الفطر صبغة الميلانين ذات اللون الأسود(Kimura و Tsuge, 1993)، وفي دراسة تم وصف شكل الجراثيم الكونيدية كمثري مع وجود تقسيمات عرضية وطولية والتقسيمات الطولية تكاد تتصل مع بعضها لتشكل خطأ عموديا متعرج قليلا(الحداد،2021). وتمتلك الجراثيم الكونيدية خلايا متعددة ذات انوية متعددة(Huangوآخرون،1996).

وتتوافق هذه النتائج مع دراسة أظهرت ان الفطر *A.alternata* عند الفحص المجهري وجد انه يكون مستعمرة رمادية فاتحة ومحاطة بحواف بيضاء التي تتحول بتقدم العمر إلى مستعمرة ذات لون أسود أو رمادي مسود، كون الفطر حوامل كونيدية قصيرة مقسمة بنية اللون تحمل الأبواغ الكونيدية بشكل مفرد أو سلاسل تتكون من 3-4 أبواغ في السلسلة، والأبواغ كبيرة الحجم عديدة الخلايا وقياس أبعادها 18.1-

5.43×10.86-57.92 ميكـرون فيهـا 0-3 حـواجز طوليـة و1-8 حـواجز عرضـية، وعـدد الخلايا من 17-2 خلية.(Aljallad،2022)



الشـكل(4) الوصـف المظهـري لطبيعـة نمـو المسـتعمرات الفطريـة والتصـبغات لاهـم المسـببات المعزولـة لحالات تعفن البذور وموت بادرات القطن .

3-4: اختبـار المقـدرة الامراضـية لعـزلات الفطـر *Fusarium* sp. و*Rhizoctonia* sp. و *Pythium* spp. و *Alternaria* sp. و*Verticillum* sp باسـتخدام بـذور القطـن مختبرياً .

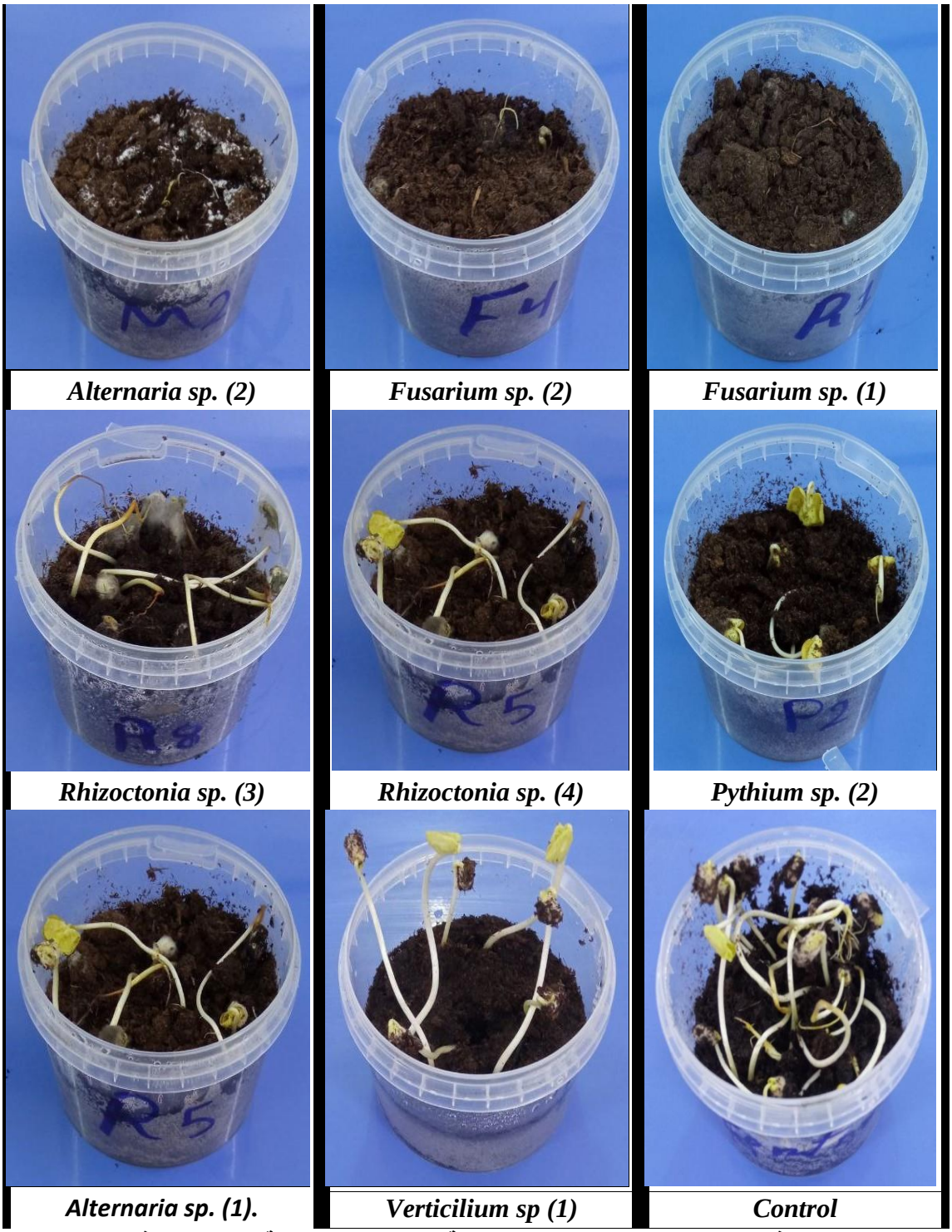
أظهـرت نتـائج القـدرة الامراضـية مختبريـا (جـدول:10) ان جميـع الفطريـات أدت إلـى خفـض فـي النسـبة المئويـة للانبـات قياسـا بمعاملـة المقارنـة التـي بلغـت النسـبة المئويـة لانبـات بـذور القطـن فيهـا 100 % (شـكل :3) ، اذ عـدمت عـزلتين للفطـر *Fusarium* sp. وعزلـة مـن الفطـر *Alternaria sp* النسـبة المئويـة للانبـات بشـكل تـام اذ بلـغ معـدل النسـبة المئويـة فيهـا 0.00% ، وكانـت اعلـى نسـبة مئويـة للتثبـيط فـي معاملـة الفطـر *Rhizoctonia* sp. بلغـت 90% ، وكـذلك الفطـر *Pythium* sp. اذ بلغـت 90% بينمـا كانـت اقـل نسـبة للتثبـيط على الفطر *Verticillum* sp. والتي بلغت 33.33%.

قد يعزى سبب التبـاين فـي المقدرة الأمراضـية لهذه العزلات إلـى الاختلافـات الوراثيـة و إلـى تبـاين هـذه العـزلات فـي طبيعـة المـواد المنتجـة منهـا مثـل السـموم و كـذلك الانزيمـات المحللـة مثـل Protase و Pectolytic و Cutinase و Celluloytic enzymes ، التـي تسـاعد الفطـر الممـرض علـى اختـراق العائـل و احـداث الاصـابة (Stepien وChelkowski، 2010). كمـا أشـارت دراسـات عديـدة إلـى أنَّ الانـواع الفطريـة الممرضـة تمتـاز بقدرتها العاليـة علـى انتـاج بعض الانزيمـات و اختلافها فـي طبيعـة المركبـات الأيضـية السـامة المنتجـة التـي قـد تعمـل بشـكل منفـرد أو مشـترك فـي منـع انبـات البـذور (Lozovaya وآخرون، 2006 و Bhattacharya و آخرون، 2013).

جـدول(10) : يوضـح اختبـار القـدرة الامراضـية للفطريـات المنتخبـة باسـتخدام بـذور القطـن على وسط البتموس مختبريا .

ت	المعاملة	النسبة المئوية للانبات %	النسبة المئوية لتثبيط الانبات %
1	المقارنة	100	0.00
2	*Rhizoctonia* sp. (1)	10	90
3	*Rhizoctonia* sp. (2)	40	60
4	*Rhizoctonia* sp. (3)	50	50
5	*Rhizoctonia* sp. (4)	26.66	73.33
6	*Rhizoctonia* sp. (5)	30	70
7	*Rhizoctonia* sp. (6)	30	70
8	*Rhizoctonia* sp. (7)	10	90
9	*Rhizoctonia* sp. (8)	46.66	53.33
10	*Rhizoctonia* sp. (9)	26.66	73.33
11	*Rhizoctonia* sp. (10)	10	90
12	*Fusarium* sp. (1)	0	100
13	*Fusarium* sp. (2)	0	100
14	*Fusarium* sp. (3)	26.66	73.33
15	*Fusarium* sp. (4)	26.66	73.33
16	*Fusarium* sp. (5)	20	80
17	*Fusarium* sp. (6)	20	80
18	*Fusarium* sp. (7)	10	90
19	*Pythium* sp. (1)	10	90
20	*Pythium* sp. (2)	26.66	73.33
21	*Pythium* sp. (3)	20	80
22	*Pythium* sp (4)	26.66	73.33
23	*Pythium* sp. (5)	50	50
24	*Alternaria sp.* (1)	10	90
25	*Alternaria sp.* (2)	0	100
26	*Verticillum* sp(1)	66.66	33.33
	L.S.D 0.05	15.49	19.83

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



الشـكل (5): نمـاذج مـن اختبـارات المقـدرة الامراضـية للفطريـات المعزولـة باسـتخدام بـذور القطـن علـى وسط البتموس مختبريا .

4-4: التشـخيص الجزيئـي و تحليـل التتـابع النيوكليتيـدي لعـزلات الفطريـات الممرضـة والمسببة لتعفن البذور وموت بادرات القطن .

اكـدت نتـائج تحليـل التتـابع النيوكليوتيـدي لـثلاث عـزلات مـن الفطريـات الممرضـة والمسـببة لمـرض تعفـن البـذور ومـوت بـادرات القطـن التـي تـم عزلهـا مـن البـذور المتعفنـة والبـادرات الميتـة، تشخيصـها تحـت عـدة انـواع متباينـة (جـدول 11) ، تعـود لاجنـاس محـددة ، فقـد اظهـرت نتـائج تحليـل التتـابع النيوكليوتيـدي للعـزلات بانهـا تعـود للفطريـات ***F.solani*** و ***F.brachygibbosum*** و ***A.alternata*** .

اذ تـم تسـجيل جميـع العـزلات فـي المركـز الـدولي للمعلومـات التقنيـة الحيـوي (NCBI) وتحـت الرمـوز الخاصـة المبينـة ازاء كـل منهـا فـي الجـدول المـذكور . اذ حققـت التسلسـلات النيوكليوتيديـة الجزيئيـة اعلـى نسـبة تطـابق تراوحـت مـابين 99.45 – 100 % مـع المنطقـة الجينيـة ITS عنـد مقارنتهـا مـع التسلسـلات النيوكليوتيديـة المكافئـة المسـترجعة مـن بنـك الجينـات فـي المركـز الـوطني للمعلومـات التقنيـة الحيويـة (NCBI) بأسـتخدام برنـامج الـ (BLAST) ولكـل عزلـة فطريـة بشـكل منفـرد . كمـا أُجريـت التحاليـل النيوكليوتيديـة باسـتعمال برنـامج (MEGA) لتحليـل العـزلات ورسـم شـجرة القرابـة بـين كـل مـن هـذه العـزلات والعـزلات المشـابهة لهـا المسـجلة بمركـز NCBI و تـم بناؤهـا مـن التسلسـل الجزيئي النيوكليوتيدي لمنطقة ITS العائدة لكل من العزلات .

جـدول(11) : التشـخيص الجزيئـي لعـزلات الفطريـات الممرضـة والمسـببة لامـراض تعفـن البـذور ومـوت بـادرات القطـن باسـتخدام تحليـل التتـابع النيوكليوتيـدي و Accession Number لها .

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	Accession Number
1	*A.alternata*	Y.N.146.aymen	ON738701.1
2	*F.brachygibbosum*	Y.N.147.aymen	ON738702.1
3	*F.solani*	Y.N.148.aymen	ON738704.1

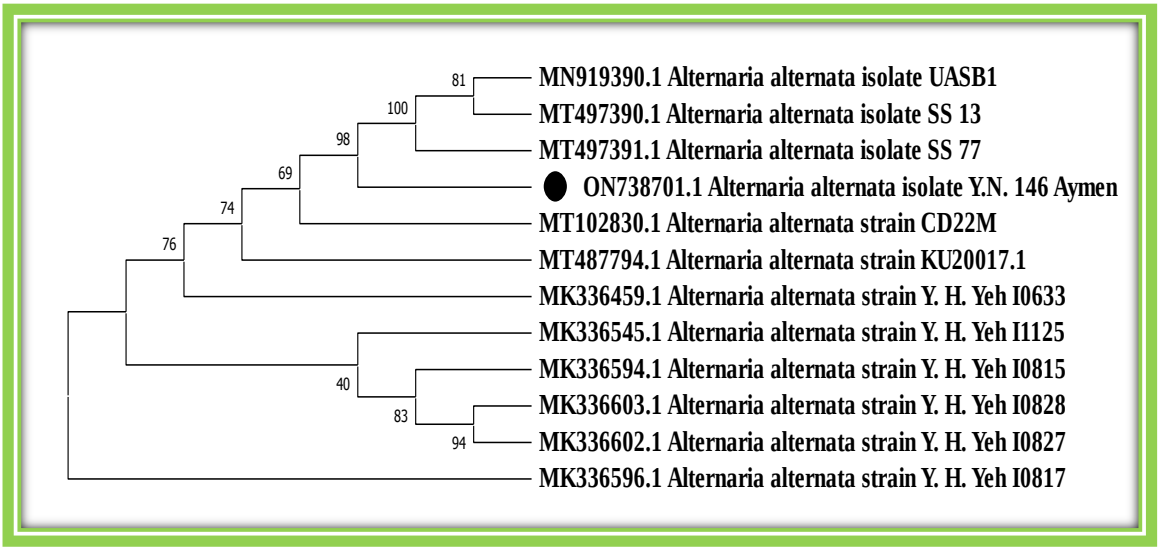
1-4-4: تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *Alternaria alternata* Y.N.146 (Aymen) ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس النوع .

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر *Alternaria alternata* Y.N.146 Aymen المعزول من بذور وبادرات القطن المصابة مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) (جدول 12). أن نسبة التشابة الوراثي بلغت (100%) مع جميع عزلات الفطر *A.alternata*

جدول 12: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر *Alternaria alternata* Y.N.146 Aymen) المعزولة من محافظة كربلاء/ قضاء الحسينية وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر نفسه المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	GenBank Accession Number	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	***A.alternata***	Y.N.146. Aymen	Iraq	ON738701.1	%100	3/9/2022
2	***A.alternata***	SS_77	India	MT497391.1	%100	25/3/2020
3	***A.alternata***	UASB1	India	MN919390.1	%100	17/11/2020
4	***A.alternata***	SS_13	India	MT497390.1	%100	25/3/2020
5	***A.alternata***	Y. H. Yeh I1125	Taiwan	MK336545.1	%100	25/1/2020
6	***A.alternata***	Y. H. Yeh I0827	Taiwan	MK336602.1	%100	25/1/2020
7	***A.alternata***	13052	Taiwan	LC494360.1	%100	18/9/2019
8	***A.alternata***	e1	Mexico	ON329675.1	%100	29/4/2022
9	***A.alternata***	Y. H. Yeh I0817	Taiwan	MK336596.1	%100	25/1/2020
10	***A.alternata***	Y. H. Yeh I0827	Taiwan	MK336602.1	%100	25/1/2020

فـي حـين أظهـر الشـكل (4) المتمثـل بالشـجرة الوراثيـة بـان هـذه العزلـة أنحـدرت مـن نفـس الأصـل الـوراثي الـذي انحـدرت منـه العـزلات الهنديـة (MT497391.1 و MN919390.1 و MT497390.1) وبتفرعـات منفصـلة عـن العـزلتين التـايوانيتين (MK336602.1 و MK336603.1) وبـدون تفـرع عـن العزلـة التايوانيـة (MK336596.1) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما.



شـكل (6): الشـجرة الوراثيـة للفطـر الممـرض *Alternaria alternata* Y.N.146 Aymen (محـددة بنقطـة ذات لـون اسـود) والتـي أنشـئت بالاعتمـاد علـى تتابعـات قواعـدها النايتروجينيـة لمنطقـة ITS-rDNA بالاضـافة إلـى تتابعـات سـلالات عالميـة لـنفس الفطرالممـرض تـم الحصـول عليهـا مـن مسـتوعب بيانـات GenBank. ان المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة neighbor-joining .

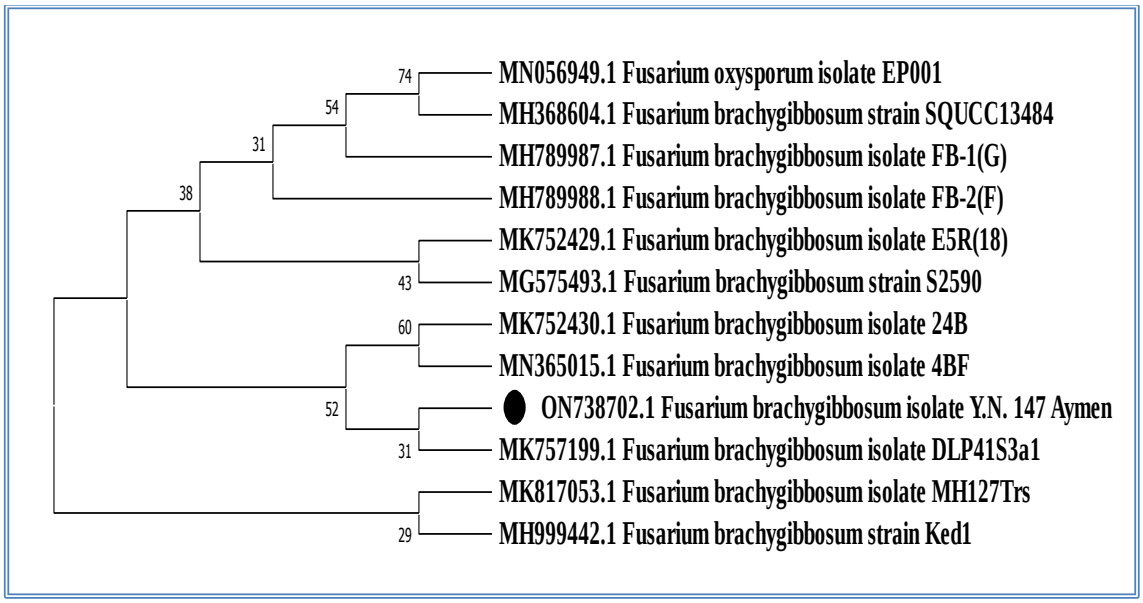
4-4-2: تحليـل التتـابع النيوكليوتيـدي للعزلـة الفطريـة *F.brachygibbosum* (Y.N.147Aymen) ومقارنـة نسـب تشـابه تتـابع القواعـد النيوكلوتيديـة لمنطقـة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس النوع .

لـوحظ مـن خـلال مقارنـة التتـابع النيوكلوتيـدي لحزمـة الحـامض النـووي للفطـر *F.brachygibbosum* Y.N.147Aymen) المعـزول مـن بـذور وبـادرات القطـن مـع البيانـات المتـوفرة فـي المركـز لمعلومـات التقنيـة الحيويـة (جـدول 13). (NCBI) أن نسـبة التشابه الوراثي بلغت (100%) مع جميع عزلات الفطر *F.brachygibbosum*.

جدول13: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر (*Fusarium brachygibbosum* Y.N.147Aymen) المعزولة من محافظة كربلاء/ قضاء الحسينية وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	GenBank Accession Number	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	*F.brachygibbosum*	Y.N.147 Aymen	Iraq	.2ON73870	%100	2022
2	*F.brachygibbosum*	DLP41S3a1	India	MK757199.	%100	2019
3	*F.brachygibbosum*	24B	Poland	MK752430.	%100	2020
4	*F.brachygibbosum*	S2590	Malaysia	MG575493.	%100	2018
5	*F.brachygibbosum*	FB-2(F)	Canada	MH789988.	%100	2018
6	*F.brachygibbosum*	BMS1	Morocco	ON642071.	%100	2022
7	*F.brachygibbosum*	UOA/HCPF 16982	Greece	ON181983.	%100	2022
8	*F.brachygibbosum*	4BF	Mexico	MN365015.	%100	2019
9	*F.brachygibbosum*	Ked1	Morocco	MH999442.	%100	2018
10	*F.brachygibbosum*	MH127Trs	Turkey	MK817053.	%100	2019

وأظهر الشكل (5) المتمثل بالشجرة الوراثية بأن العزلة (Y.N.147Aymen) ظهرت في نفس التفرع (clade) الذي ظهرت فيه العزلة الهندية (MK757199.1) وبتفرعات منفصلة (clades) عن العزلتين المغربية والتركية (MH999442.1 وMK817053.1)على التوالي بسبب التباعد الوراثي بينهما.



شـكل (7): الشـجرة الوراثيـة للفطـر الممـرض *Fusarium brachygibbosum* Y.N.147Aymen (محـددة بنقطـة ذات لـون اسـود) والتـي بنيـت اعتمـادا علـى تتابعـات قواعـدها النايتروجينيـة لمنطقـة ITS-rDNA بالاضـافة إلـى تتابعـات سـلالات عالميـة لـنفس الفطـر الممـرض تـم الحصـول عليهـا مـن مسـتوعب بيانات GenBank. ان المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة neighbor-joining .

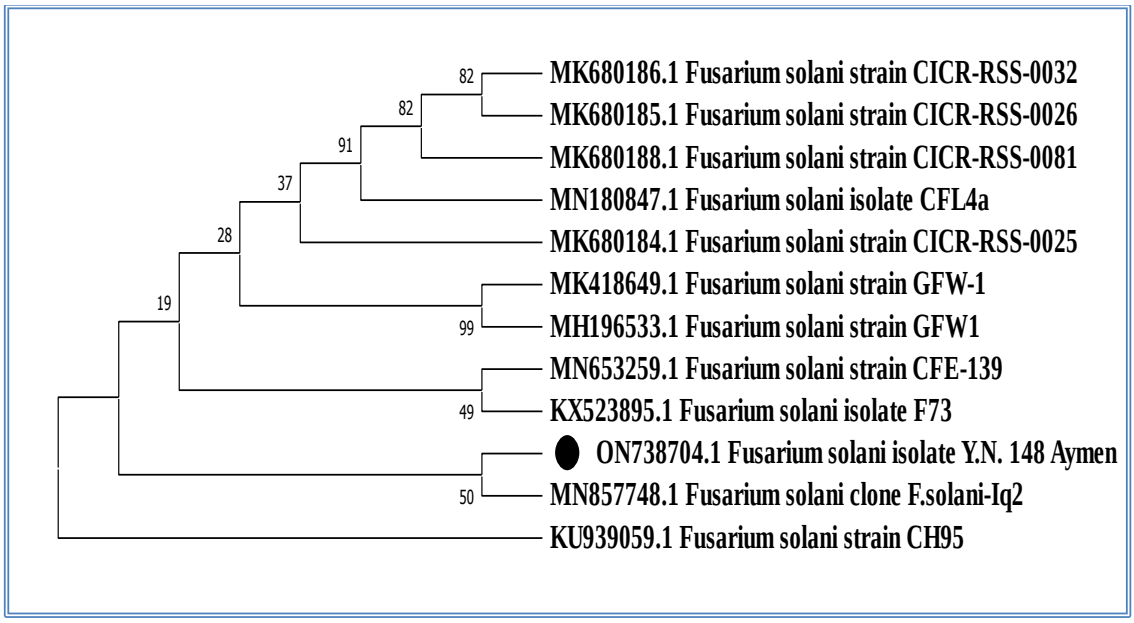
3-4-4: تحليـل التتـابع النيوكليوتيـدي للعزلـة الفطريـة (*F.solani* Y.N.148 Aymen) ومقارنـة نسـب تشـابه تتـابع القواعـد النيوكلوتيديـة لمنطقـة الجـين ITS مـع العـزلات الفطرية االعالمية لنفس النوع

لـوحظ مـن خـلال مقارنـة التتـابع النيوكلوتيـدي لحزمـة الحـامض النـووي للفطـر(*Fusarium solani* (Y.N.148 Aymen بـذور وبـادرات القطـن المصـابة مـع البيانـات المتـوفرة فـي المركـز لمعلومـات التقنيـة الحيويـة (NCBI) أن نسـبة التشـابة الـوراثي بلغـت (100%) مـع عـزلات الفطـر *Fusarium solani* المعزولـة مـن الصـين (KU939059.1) ومـن العـزلات الهنديـة (MN653259.1 و MK680185.1 و MK680184.1 و) والبرازيـل (ON795087.1) ونيجيريـا (OM956392.1) (جدول14) في حين بلغت (99.80%) بالنسبة للعزلة الهندية (OM980195.1).

جـدول 14: مقارنــة بــين نســب تشــابه تتــابع القواعــد النيوكلوتيديــة لمنطقــة الجــين ITS لعزلــة الفطــر (*Fusarium solani* Y.N.148 Aymen) المعزولــة مــن محافظــة كـربلاء/ قضــاء الحسـينية وبـين العـزلات الفطريــة الاخـرى لـنفس الفطـر المسـجلة عالميـا فـي المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI) .

تأريخ التسجيل في NCBI	Sequence similarity %	GenBank Accession Number	مكان العزلة Origin	رمز العزلة Isolate name	اسم الفطر Fungal name	ت
16/7/2022	%100	ON738704.1	Iraq	Y.N.148Aymen	*F. solani*	1
26/9/2019	%100	MN857748.1	Iraq	Iq2	*F. solani*	2
10/7/2022	%100	OM956392.1	Nigeria	CUAB-SAID001	*F. solani*	3
13/11/2019	%100	MN653259.1	India	CFE-139	*F. solani*	4
1/4/2019	%100	MK680185.1	India	CICR-RSS-0026	*F. solani*	5
31/12/2018	%100	KX523895.1	Iran	F73	*F. solani*	6
1/4/2019	%100	MK680184.1	India	CICR-RSS-0025	*F. solani*	7
31/1/2018	%100	KU939059.1	China	CH95	*F. solani*	8
22/7/2022	%100	ON795087.1	Brazil	R29	*F. solani*	9
18/3/2022	%99.80	OM980195.1	India	MFs1	*F. solani*	10

كما أظهر الشكل (6) المتمثل بالشجرة الوراثية (Neighbor joining tree) بأن العزلة (Y.N.148 Aymen) ظهرت في نفس التفرع (clade) الذي ظهرت فيه العزلة العراقية (MN857748.1) وبتفرع منفصل (clade) عن العزلتين الهندية (MK680185.1 و MK680186.1) وبدون أي تفرع مع العزلة الصينية (KU939059.1) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما.



شكل (8): الشجرة الوراثية للفطر الممرض *Fusarium solani* Y.N.148Aymen (محددة بنقطة ذات لون اسود) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة-ITS rDNA بالاضافة إلى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات .GenBank ان المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة . neighbor-joining

5-4: اختبار المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد العزلات الفطرية الممرضة مختبريا

تم اختبار المقدرة التضادية لعشر عزلات فطرية تابعة للفطر *Trichoderma* spp. تم الحصول عليها من دراسات سابقة ، بعد اثبات قدرتها التضادية ضد مجموعة من الفطريات الممرضة، اذ تم اختبارها ضد العزلات الفطرية الممرضة المسببة لامراض تعفن البذور وموت بادرات القطن المنتخبة وهي *F.brachygibbosum* و*F.solani* و*A.alternata*. (جدول:15و شكل:7) حيث حققت عزلات الفطر *Trichoderma* spp. قدرة تضادية عالية ضد الفطريات الممرضة عند ظروف المختبر فكانت اعلى قدرة تضاديةبدرجة 1 للعزلة *T.koningiopsis* على الفطر الممرض *Fusarium.brachygibbosum* واقل قدرة تضادية بدرجة 3 للعزلتين *T.harzianum2* و *T.reesei2*.

كما أظهرت النتائج المقدرة التضادية للفطر spp *Trichoderma* على الفطر الممرض *F.solani* حيث كانت اعلى قدرة تضادية للعزلة *T. pseudokoningii*

بدرجة 1 واقل قدرة تضادية للعزلة *T.reesei*2 بدرجة 3 ، اما العزلتين *T.koningiopsis* والعزلة *T. reesei* فأن نسبة التضاد لهما على الممرض 2 .(جدول 12).

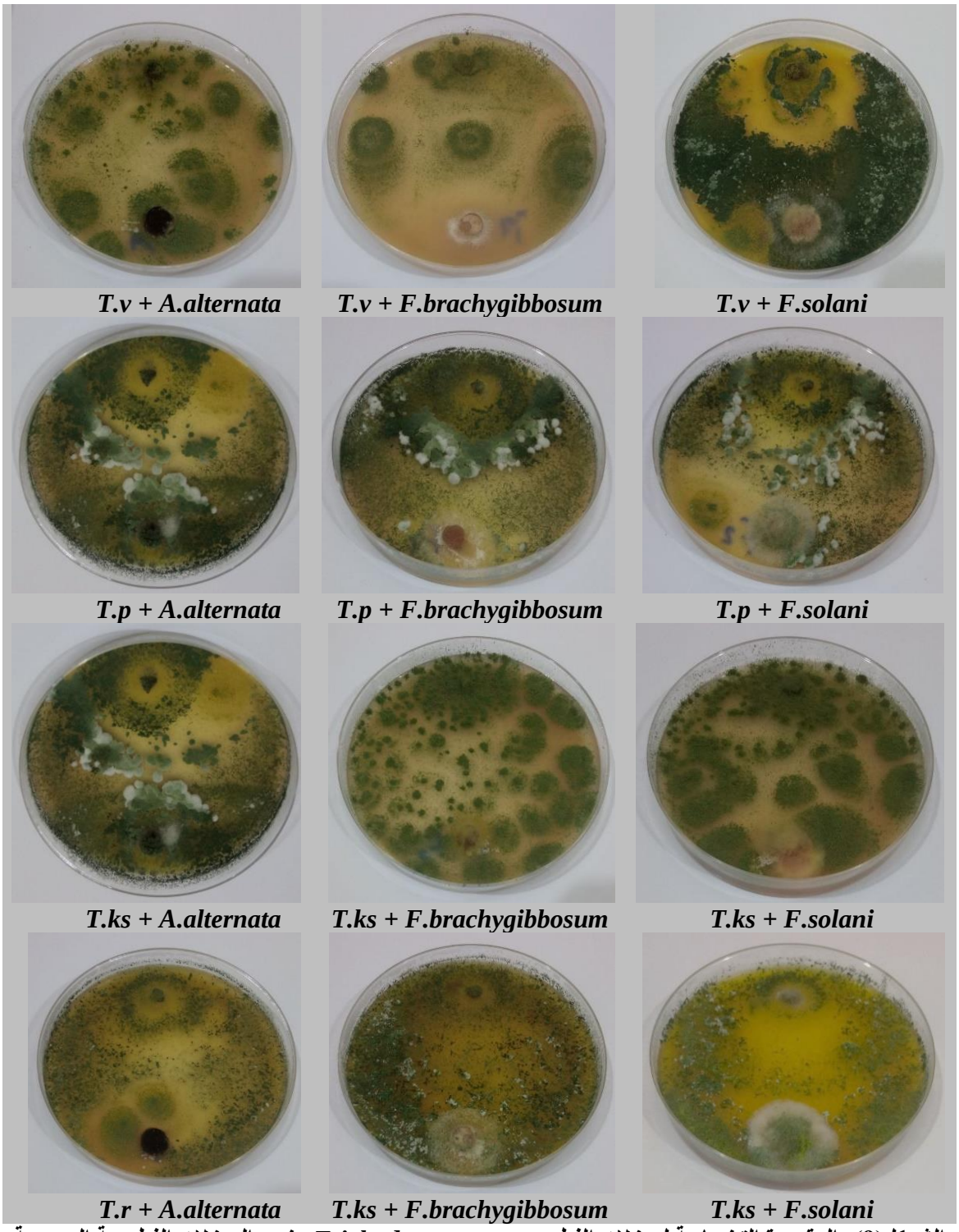
الفطر *Alternaria alternata* فكانت نتائج المقدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp عليه عالية،حيث حققت اربع عزلات الفطر *Trichoderma* spp مقدرة امراضية بدرجة 1 للعزلات *T.viride* و*T.pseudokoningii* و *T.koningiopsis* و *T. reesei* ومن المعروف امتلاك الفطر*Trichoderma* spp القدرة على تثبيط نمو الفطريات الممرضة للنبات وذلك باستخدام آليات مختلفة مثل التطفل الفطري والتنافس على المكان والغذاء وإنتاج المواد المضادة للفطريات. (Verma وآخرون ،Kaewchai, 2007 ، 2009 ، سعاد، 2011) .

يعزى الكفاءة التضادية العالية لانواع الفطر *Trichoderma* spp. *على المسببات* المرضية إلى تكوين العديد من مركبات الايض الثانوي منها المضادات الحيوية مثل gilotoxin و virindin و trichodermine ، والتي ثبت أن لها نشاطًا مضادًا للفطريات للسيطرة على مسببات الأمراض المختلفة التي تنتقل عن طريق التربة ،نستنتج أن انواع *Trichoderma* spp. لها خاصية معادية في السيطرة على المسببات المرضيى (Kareem وAl-Araji، 2017 و Inovejas و Divina، 2018 والخفاجي، 2020) .

جـدول(15) القـدرة التضـادية لعـزلات الفطـر *Trichoderma* spp. ضـد الفطريـات الممرضة

ت	المعاملات	القـدرة التضـادية لعـزلات الفطـر *Trichoderma* spp. ضد الفطريات الممرض			
		F. brachygibbosum	*F.solani*	*A.alternata*	المعدل النهائي
1	المقارنة السالبة Control (% لنمو مستعمرة الفطر)	5	5	5	5
2	المقارنة (بدون أي اضافة) (% لتثبيط نمو الفطر)	00.00	00.00	00.00	00.00
3	الممرض + مستحضر الفطر(T.v) *T.viride*	1	2	1	1
4	الممرض + مستحضر الفطر (T.p) *T.pseudokoningii*	2	1	1	1
5	الممرض + مستحضر الفطر (T.ks) *T.koningiopsis*	1	1	1	1
6	الممرض + مستحضر الفطر (T.r) *T. reesei*	2	1	1	1
7	الممرض + مستحضر الفطر (T.k) *T.koningii*	3	2	1	2
8	الممرض + مستحضر الفطر(T.h) *T. harzianum*	2	2	2	2
9	الممرض + مستحضر الفطر (T.r2) *T. reesei*	3	3	3	3
10	الممرض + مستحضر الفطر (T.r3) *T. reesei*	3	3	3	3
11	الممرض + مستحضر الفطر(T.h2) *T. harzianum*	3	3	3	3
12	الممرض + مستحضر الفطر (T.a) *T.asperellum*	2	3	3	3

* كل معاملة اجريت بثلاث تكرارات



الشـكل(9): المقـدرة التضـادية لعـزلات الفطـر *Trichoderma* spp. ضـد العـزلات الفطريـة المسـببة لمرض تعفن البذور وموت البادرات

وجد في دراسات سابقة قدرة انواع مختلفة من الفطر *Trichoderma* spp. في تثبيط نمو الكثير من الفطريات بسبب امتلاكه آليات مختلفة في المكافحة و منها ظاهرة التطفل على خيوط الفطر الممرض و التنافس على المواد الغذائية و احتلال مكان الوجود و انتاج المضادات الحيوية المثبطة للعديد من انزيمات المسبب المرضي و كذلك قدرته على انتاج بعض المركبات السامة مثل Trichothecin و Gliotoxin و Viridin ، اثبتت كفاءة انواع الفطر *Trichoderma* spp. في تثبيط نمو المسببات المرضية حيث يعد الفطر *Trichoderma* spp. من فطريات المكافحة التي تمتلك آليات مختلفة في مقاومة المسببات المرضية الفطرية منها الفطر *Fusarium* spp. و من تلك الآليات هي التطفل على خيوط الفطر الممرض و المنافسة على البيئة الغذائية وأنتاج بعض المضادات الحيوية ذات التأثير المثبط لبعض أنزيمات الفطر الممرض ، فضلا عن قابليته على أنتاج بعض المركبات الكيميائية ذات التأثير السام مثل Gliotoxin و Trichothecinو Viridin (Singh و آخرون، 2014).

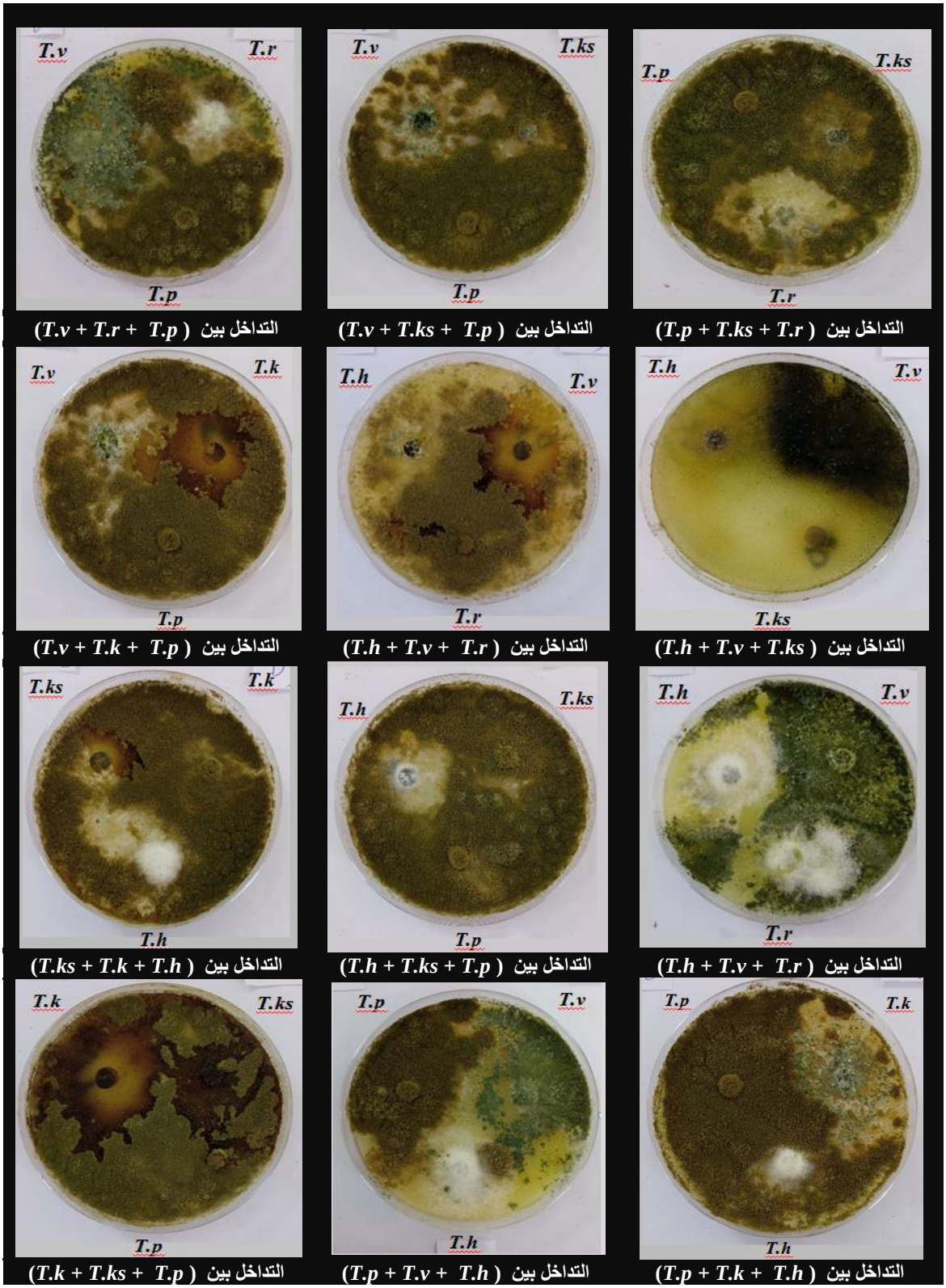
6-4: اختبار تأثير التداخل بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp

بينت نتائج هذا الاختبار (جدول:16 والشكل:8) ان التداخل الثلاثي بين العزلات الفطرية للفطر *Trichoderma* spp ، ان *T.viride* و *T.pseudokoningii* و*T.koningiopsis* و T. *reesei* اكثر العزلات توافقية ولم تظهر أي تضاد فيما بينها مما يمكننا من عمل توليفة بين هذه العزلات المتوافقة ، إذ أظهرت الدراسات عند عمل التوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma spp* ضد المسببات المرضية فإن نسبة المرض تنخفض وبشكل كبير.

جدول (16) اختبار التداخل بين 6 عزلات من الفطر *Trichoderma* spp.

ت	المعاملة	العزلة 1	التوافق 1←2	العزلة 2	التوافق 2←3	العزلة 3	التوافق 1←3
1	معاملة 1	*T.viride*	(+)	*T.pseudokoningii*	(+)	*T. reesei*	(+)
2	معاملة 2	*T.viride*	(+)	*T.pseudokoningii*	(+)	*T.koningiopsis*	(+)
3	معاملة 3	*T.viride*	(+)	*T.pseudokoningii*	(-)	*T. harzianum*	(+)
4	معاملة 4	*T.viride*	(+)	*T.pseudokoningii*	(-)	*T. koningii*	(+)
5	معاملة 5	*T.viride*	(+)	*T. reesei*	(+)	*T.koningiopsis*	(+)
6	معاملة 6	*T.viride*	(+)	*T. reesei*	(-)	*T. harzianum*	(+)
7	معاملة 7	*T.viride*	(+)	*T. reesei*	(-)	*T. koningii*	(+)
8	معاملة 8	*T.viride*	(+)	*T.koningiopsis*	(-)	*T. harzianum*	(+)
9	معاملة 9	*T.viride*	(+)	*T.koningiopsis*	(+)	*T. koningii*	(+)
10	معاملة 10	*T.viride*	(-)	*T. harzianum*	(-)	*T. koningii*	(+)
11	معاملة 11	*T.pseudokoningii*	(+)	*T. reesei*	(+)	*T.koningiopsis*	(+)
12	معاملة 12	*T.pseudokoningii*	(+)	*T. reesei*	(+)	*T. harzianum*	(+)
13	معاملة 13	*T.pseudokoningii*	(+)	*T. reesei*	(-)	*T. koningii*	(+)
14	معاملة 14	*T.pseudokoningii*	(+)	*T.koningiopsis*	(-)	*T. harzianum*	(+)
15	معاملة 15	*T.pseudokoningii*	(+)	*T.koningiopsis*	(-)	*T. koningii*	(+)
16	معاملة 16	*T.pseudokoningii*	(-)	*T. harzianum*	(-)	*T. koningii*	(+)
17	معاملة 17	*T. reesei*	(+)	*T.koningiopsis*	(-)	*T. harzianum*	(+)
18	معاملة 18	*T. reesei*	(+)	*T.koningiopsis*	(-)	*T. koningii*	(+)
19	معاملة 19	*T. reesei*	(-)	*T. harzianum*	(-)	*T. koningii*	(+)
20	معاملة 20	*T.koningiopsis*	(-)	*T. harzianum*	(-)	*T. koningii*	(+)

* كل معاملة اجريت بثلاث تكرارات



الشكل(10) صور توضيحية لاختبارالتداخل بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp

وهذا يتفق مع دراسات أكدت أن اختبارات الزراعة المزدوجة بين *Botrytis. cinerea* وعزلات العوامل الحيوية *T.harzianum* و *T. viride* أظهرت أن تأثير معظم العزلات عملت على تثبيط المسبب المرضي، بالإضافة إلى أن المواد المتطايرة للعزلات من *T. harzianum* و *T. viride* نفسها حققت أعلى معدل تثبيط ضد B. cinerea بلغ 77٪ ، أظهر أيضًا أن عوامل المكافحة الاحيائية *T. harzianum* و *T. viride* قد حققت انخفاضًا في معدل الإصابة وشدة الإصابة بالفطريات الممرضة الأخرى.(Al-Esawee و AL-Taae ، 2016). وفي دراسة تم فيها اختبار التأثير التازري لعزلات الفطر *Trichoderma* spp اثبتت عند استخدام اكثر من عزلة متوافقة فيما بينها سجلت اعلى نسبة في تثبيط الفطرالممرض وازدياد نمو النبات.(البحراني،2021). وفي دراسة أخرى حققت معاملات التوليفة التوافقية لعزلات *Trichoderma* spp اعلى زيادة في النسبة المئوية لإنبات بذور الباميا التي تفوقت على المعاملة المنفردة ، وخفض معنوي في النسبة المئوية لموت البادرات.(الطائي،2021).

7-4: الكشف عن قابلية عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma sp* المنتخبة على انتاج السمين الفطريين Trichodermin وGliotoxin

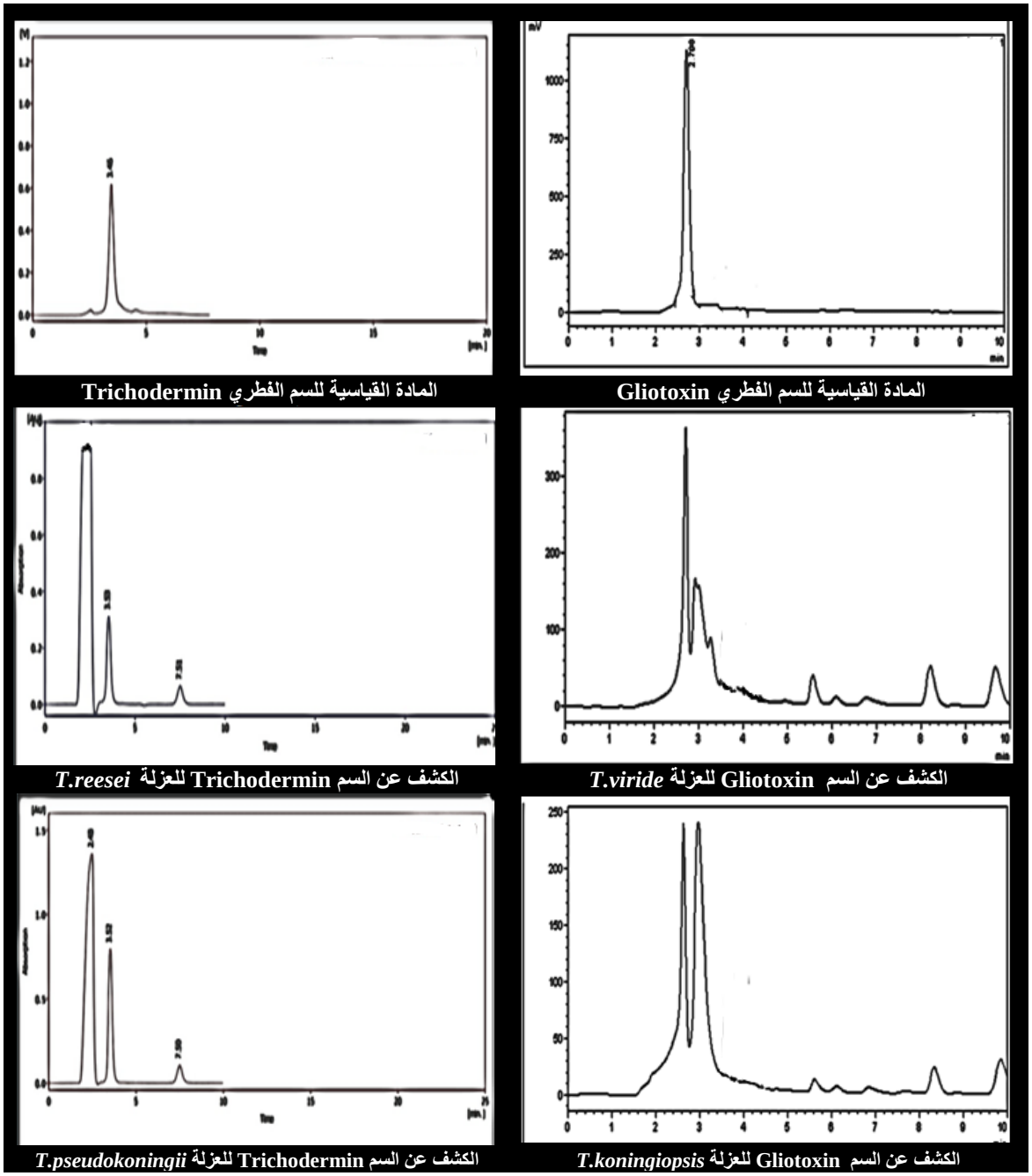
أظهرت النتائج (جدول :17والشكل: 9) عند ظروف التجربة وجود السم الفطري Gliotoxin في العزلتين الفطرية *Trichoderma koningiopsis* و *Trichoderma viride* بمعدل (118.90ميكروغرام \غم) ومعدل (98.73ميكروغرام \غم).

وايضا بينت النتائج قدرة العزلات الفطرية *Trichoderma reesei* و *T.pseudokoningii* والعزلة *Trichoderma viride* على انتاج السم الفطري Trichodermin . وتفوقت العزلة *Trichoderma reesei* بمعدل الانتاج اذ بلغ 156.8 ميكروغرام \غم على العزلتين *T.pseudokoningii* الذي كان معدل تركيز السم في معاملاتها 126.4 و *Trichoderma viride* 116.2 (ميكروغرام \غم) على التوالي.

وكان مماثلا لما ذكر في الدراسات السابقة ان السم gliotoxin ينتج عن عدة أنواع من *Trichoderma* spp. مثل *T. virens* و *T. lignorum* و *T. viride* (Scharf وآخرون ، 2016 و Silva، 2019) حيث بين Chohan وآخرون 2019 بان العديد من انواع الفطر *Trichoderma* spp. لها القابلية على انتاج السموم الفطرية التي لها القابلية على تثبيط المسببات المرضية التي من اهمها *T. harzianum* و *T. viride* يمكن أنْ تستعمر في منطقة الرايزوسفيرا وإنتاج المضادات

الحيوية مثل viridin و gliotoxin وإنزيمات تحلل جدار الخلية .واثبت (Zaid وآخرون ،2022) ان بعض سلالات *Trichoderma spp.* تنتج سم gliotoxin، وهو سم فطري من نوع Epithiodioxopiperazine (ETP) من مركبات الايض الثانوي. إنه يحث على موت الخلايا المبرمج في الممرض . وفي دراسة أجرتها البحراني (2021) اثبتت فيها انتاج عزلات مختلفة من الفطر *Trichoderma* spp.للسم gliotoxin حيث انتجت العزلات *Trichoderma viride* ، *Trichoderma koningii.*،*Trichoderma pseudokoningii* ، *Trichoderma harzianum*.، *Trichoderma koningiopsis* كميات كبيرة ومختلفة من هذا السم.

وكذلك تتفق هذه النتيجة مع نتائج دراسات اخرى حول قدرة العزلات الفطرية *Trichoderma* spp على انتاج السم الفطري Trichodermin اذ تم عزل هذا السم اول مرة من الفطر *T.viride* من خلال راشح الفطر وتم تصويره بواسطة X-ray و الرنين المغناطيسي النووي (Godtfredsen وVangedal,1964) .



الشـكل (11): الكشـف عـن قـدرة العـزلات المنتخبـة للفطـر الاحيـائي *Trichoderma sp* علـى انتـاج السمين الفطريين Trichodermin وGliotoxin

جـــــدول(17) التقـــــدير الكمـــــي والنـــــوعي للســـــمين الفطـــــريين Gliotoxin و Trichodermin لعزلات الفطر *Trichoderma spp*.

ت	اسم المركب	العزلات الفطرية المنتجة		التقدير الكمي ميكروغرام / غم
1	السم الفطري Gliotoxin	*Trichoderma koningiopsis*	(+)	118.90
		Trichoderma viride	(+)	98.73
		Trichoderma reesei	(-)	------
		T.pseudokoningii	(-)	------
2	السم الفطري Trichodermin	*Trichoderma koningiopsis*	(-)	------
		Trichoderma viride	(+)	116.2
		Trichoderma reesei	(+)	156.8
		T.pseudokoningii	(+)	126.4

4-8: تـــاثير الســـمين الفطـــريين Trichodermin و Gliotoxin فـــي تثبـــيط نمـــو العزلات الفطريات الممرضة على الوسط الزرعي PDA.

اذ أظهـرت نتـائج اختبـار تـاثير السـمين Trichodermin و Gliotoxin فـي راشـح عـزلات الفطـر *Trichodermia spp* لـه تـأثير واضـح و بفـروق معنويـة كبيـرة فـي تثبـيط نمـو الفطريـات الممرضـة مقارنـة بنمـو الفطريـات الممرضـة بـدون إضـافة الفطـر *Trichodermia spp* (جـدول 18)، حيـث كانـت اعلـى نسـبة تثبـيط 86.11%. علـى الفطـرين *A.alternata* و *F.brachygibbosum* فـي راشـح العـزلتين *T.viride* و *T.koningiopsis* علـى التـوالي فـي حـين كانـت اقـل نسـبة تثبـيط 66.65% علـى الفطـر *F.brachygibbosum* في راشح العزلة *T. reesei*.

وفـي معاملـة الفطـر *A.alternata* فكانـت اعلـى نسـبة تثبـيط 86.11% فـي راشـح الفطـر *T.viride* واقـل نسـبة تثبـيط 82.20 فـي راشـح العزلـة *T.koningiopsis*. بينمـا أعطـت معاملـة الفطـر *F.brachygibbosum* اعلـى نسـبة تثبـيط 86.1% للعزلـة *T.koningiopsis* واقـل نسـبة تثبـيط 66.65% للعزلـة *T. reesei*. كمـا حققـت نتـائج الراشـح علـى الفطـر *F. solani* اعلـى نسـبة تثبـيط 86.10% للعزلـة *T.pseudokoningii* واقـل نسـبة تثبـيط 72.22% فـي راشـح العزلـة *T. viride*. وبشـكل عـام يعـزى تـأثير الوراشـح لعـزلات الفطـر *Trichodermia spp* علـى نمـو الفطريـات

الممرضة إلى احتواء الراشح على الكثير من مركبات الايض الثانوي التي تعمل على تثبيط نمو الفطريات الممرضة للنبات التي هي السمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin مما له من تأثيرات مباشرة في تثبيط نمو الفطريات الاخرى . وهناك دراسات اتفقت مع نتائج تثبيط الرواشح في نمو الفطريات الممرضة (الطائي،2021.والبحراني،2021).

جدول (18) كفاءة السمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin في تثبيط لعزلات الفطريات الممرضة

ت	المعاملات	% لتثبيط الفطر *F.brachygibbosum*	% لتثبيط الفطر *F. solani*	% لتثبيط الفطر *A.alternata*	معدل % للتثبيط
1	الممرض بدون أي إضافة	%0.00	%0.00	%0.00	%0.00
2	الممرض + راشح *T.viride*	83.30	72.22	86.11	80.54
3	الممرض + راشح *T.pseudokoningii*	69.44	86.10	83.33	79.62
4	لممرض + راشح *T.koningiopsis*	86.10	75.00	82.20	81.10
5	الممرض + راشح *T. Reesei*	66.65	72.23	83.33	74.07
	L.S.D (0.05)	6.33	6.72	6.53	-----

4-9 : الكشف عن قابلية عزلات الفطر *Trichoderma sp* على تكوين الاجسام الحجرية ودعم المبيد الحيوي بها .

أظهرت نتائج التجارب المختبرية في إمكانية انتاج اجسام حجرية من عزلات الفطر *Trichoderma spp* (*T.viride* و*T.pseudokoningii* و *T. reesei* و*T.koningiopsis*) (الشكل 10)، على الوسط السائل ، وبكميات جيدة مع وجود بعض الاختلافات الطفيفة بين العزلات .

ويعزى ذلك إلى تعرض الفطر إلى ظروف اجهاد مختلفة ،(كارتفاع وانخفاض درجة الحرارة) اواي ظروف قاسية اخرى تجعل الوسط غير ملائمة للنمو ، لذا يعمل الفطر على انتاج الاجسام الحجرية (MS) للحفاظ على ديمومة الفطر ومقاومة الظروف

القاسية حيث تمتلك الاجسام الحجرية قابلية مقاومة الجفاف ودرجات الحرارة المنخفضة وظروف الخزن مع بقائها بكامل حيويتها بفترة صلاحية ممتازة في ظروف التخزين الباردة مع عدم وجود خسارة في إنتاج الكونيديات. (kobori وآخرون،2015) والذي اثبت ان افضل الأوساط المستخدمة من ناحية اعداد الاجسام الحجرية هو وسط دقيق بذور القطن مع السكر، اذ يعتبر دقيق بذور القطن مصدراً غنياً بالنتروجين الطبيعي .

كما اظهرت نتائج اختبار كفاءة وحيوية الاجسام الحجرية على انتاج الغزل الفطري والكونيديات، بينت النتائج بعد جمع الاجسام الحجرية من الوسط السائل وتنقيتها وتجفيفها وخزنها ، امتلاكها المقدرة على التنمية على وسط MEA ،حيث نمت وغطت كامل الوسط وبغزارة كبيرة مما يدل على مقدرتها على النمو وإنتاج الكونيديات في حال استعمالها تحت الظروف البيئية الملائمة للنمو. فقد بينت دراسة اجراها (Jackson وآخرون،2017) على العديد من أنواع الفطر *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma lignorum* و *Trichoderma viridae* و *Trichoderma reesei* و *Trichoderma koningii* و *Trichoderma pseudokoningii* و *Trichoderma polysporum* و*Trichoderma hamatum* جميع هذه الأنواع انتجت الاجسام الحجرية في الوسط السائل المكون من دقيق بذور القطن والسكر، مما تدعم في تحضير المبيد الحيوي قيد الدراسة من توليفة هذه العزلات الفطرية (*T.viride* و*T.pseudokoningii* و *T. reesei* و*T.koningiopsis*) والمزعم استخدامه في مكافحة المسببات المرضية المسببة لمرض تعفن البذور وموت بادرات القطن وغيرها .

الشكل(12): يبين اختبار قدرة عزلات الفطر *Trichoderma sp* على تكوين الاجسام الحجرية

10-4 : تصنيع المبيد الحيوي لعزلات الفطر *Trichoderma* spp.

اظهرت النتائج امكانية تصنيع المبيد الحيوي الذي اطلق عليه (FOUR.T) بتوليفة توافقية للعزلات الاربعة وهي *T.viride*، *T.pseudokoningii* ، *T.reesei* ، *T.koningiopsis* بعد اثبات كفاءتها التضادية ضد المسببات المرضية ، مقدرتها على انتاج الاجسام الحجرية (Micro sclerotia) على الوسط السائل، وانتاجها للسموم الفطرية Trichodermin وGliotoxin، وتدعيم المبيد الحيوي بهما .وزيادة فاعلية المبيد التضادية ضد المسببات المرضية، اذ اظهرت كفاءته بغزارة الكونيديات المتكونه على الوسط التخمري (الشكل11) ، والاحتفاظ بحيويتها على وسط الحفظ والتحميل .

بينما اظهرت نتائج كفاءته وحيوية المبيد (FOUR.T) بعد الخزن لمدة اربعة اشهر تحت الظروف الاعتيادية (درجة حرارة الغرفة) . كفاءة عالية بمكافحة بعض مسببات امراض النبات ، بنسب لم تختلف عن فعالية المبيد في فترات بداية تصنيعه ، ضد مسببات تعفن البذور وموت بادرات القطن .

تصنيع المبيد الحيوي (FOUR.T) لعزلات الفطر *Trichoderma* spp.

الشكل(13): مراحل من تصنيع المبيد الحيوي (FOUR.T) لعزلات الفطر *Trichoderma* spp.

حيث اظهرت النتائج تفوق جريش الذرة الصفراء في نمو فطر *Trichoderma spp* على بقية الأوساط في الدراسة، وفي نفس الدراسة اثبتت ان الجريش ذو المحتوى الرطوبي 20% والمحضن بدرجة حرارة 30±2 م^5 كان افضل تركيز فيه لنمو الفطر وعدد الابواغ المتكونة.

كما استخدم زيت فول الصويا كوسط حامل لكفاءته الجيدة في الحفاظ على الحيوية لقاح فطر المقاومة الحيوية وبنسبة 1:3 (جريش الذرة إلى زيت فول الصويا) (علوان ،2005) حيث هذه النسبة تكون كافية لانطلاق الابواغ فيها وتحافظ على الابواغ من الجفاف، حيث وجد ان حيوية المستحضر وتحمله الخزن لفترات طويلة والجفاف ودرجات الحراة العالية يعود إلى طبيعة المادة الحاملة (Nikkeeran و Jeyarajan،1996).

4-11: اختبار التأثير التآزري لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin مع المبيد الحيوي (FOUR.T) ضد مسببات مرض تعفن البذور وموت بادرات القطن تحت الظروف الحقلية .

4-11-1: اختبار التأثير التآزري للتوليفة بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin مع المبيد الحيوي (FOUR.T) ضد الفطر *Fusarium.brachygibbosum* تحت الظروف الحقلية.

أظهرت نتائج القدرة التضادية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. ضد العزلات الفطرية الممرضة في الأصص البلاستيكية (جدول:19،20 و شكل: 12) وجود فروق معنوي بين عزلات الفطرالاحيائي والفطريات الممرضة إذ أعطت اعلى نسبة انبات لبذور القطن عند استخدام عزلات الفطر *Trichoderma* spp منفردة عند معاملة البذور بالفطر الممرض *Fusarium.brachygibbosum* هي 93.33% ونسبة تثبيط 6.66% للعزلة *T.viride* تلتها العزلات *T.pseudokoningii* و*T.koningiopsis* و *T. reesei* *بنسبة انبات بذور* 86.66% ونسبة تثبيط 13.33% لكل عزلة.

كما ابدى الفطر *Trichoderma* spp مقاومة عالية ضد الفطر الممرض *F.brachygibbosum* عند استخدام توليفات تأزرية من عزلات الفطر *Trichoderma* spp حيث أظهرت النتائج اعلى نسبة انبات بلغت 100% ونسبة تثبيط بلغت 0.00% عند استخدام المستحضر الحيوي من العزلات(T.v) + (T.p) + (T.ks) + (T.r)،تلتها التوليفات (T.v) + (T.p) + (T.ks) والتوليفة (T.v) + (T.p) + (T.r) و التوليفة (T.v) + (T.ks) + (T.r) والتوليفة (T.p) + (T.ks) + (T.r) والتوليفة (T.v) + (T.p) بنسبة انبات 96.66% ونسبة تثبيط 3.33 ، اما نسبة الانبات للعزلات (T.v) + (T.ks) والتوليفة (T.v) + (T.r) والتوليفة (T.p) + (T.ks) والتوليفة (T.ks) + (T.r) فكانت 93.33% ونسبة تثبيط 6.66%. وكانت اقل نسبة انبات في التوليفة 90% للعزلة (T.p) + (T.r) ونسبة التثبيط 10%، فقد لوحظ أن هناك فرقاً معنوياً كبيراً مقارنة مع نسبة الانبات عند إضافة الممرض فقط بلغت 10% ونسبة التثبيط 90%.

وكانت نتائج نسبة الإصابة ونسبة شدة قد سجلت فرقاً معنوياً كبيراً عند إضافة عزلات *Trichoderma* spp مقارنة بنسبة الإصابة لفطر الممرض للنبات *F.brachygibbosum* من غير إضافة الفطر المقاوم، فكان هناك تأثير للعزلات *Trichoderma* spp على نموالفطر الممرض عند اضافتها منفردة بلغت أعلى نسبة

إصـــابة 20% واعلـــى نســـبة شـــدة مـــرض 15.55% للعزلـــة *T. reesei* انخفضـــت نســـبة الإصـــابة وشـــدة المـــرض عنـــد اســـتخدام توليفـــات مـــن عـــزلات الفطـــر *Trichoderma* spp فبلغـــت اعلـــى نســـبة إصـــابة 16.66% واعلـــى شـــدة مـــرض10% للتوليفـــة (T.P) + (T.KS) ، واقـــل نســـبة إصـــابة3.33% ونســـبة شـــدة مـــرض 3.33% لتوليفـــة المبيـــد الحيـــوي (FOUR.T) .

يعـود انخفـاض نسـبة الإصـابة وشـدة الاصـابة فـي التوليفـات لعـزلات الفطـر المقـاوم إلـى ازديـاد كميـة السـمين Gliotoxin و Trichodermin المنتجـة مـن العـزلات المتوافقـة مـع بعضـها والتـي تـؤثر بشـكل كبيـر علـى تثبـيط نمـو الفطريـات الممرضـة للنبـات وحمايـة النبـات من الإصابة بها (الطائي،2021، و البحراني،2021).

جدول(19) اختبار التأثير التآزري بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في خفض نسبة وشدة الاصابة بالفطر *F.brachygibbosum* على بادرات القطن حقلياً .

ت	المعاملات	النسبة المئوية لانبات البذور	النسبة المئوية للتثبيط	النسبة المئوية للاصابة	النسبة المئوية لشدة الاصابة
1	المقارنة Control (بدون اي اضافة)	100	0.00	0.00	0.00
2	اضافة الفطرالممرض فقط *F.brachygibbosum*	10	90	96.66	91.11
3	الممرض + مستحضر الفطر *T.viride* (T.v)	93.33	6.66	10	7.77
4	الممرض + مستحضر الفطر *T.pseudokoningii* (T.p)	86.66	13.33	13.3	4.44
5	الممرض + مستحضر الفطر *T.koningiopsis* (T.ks)	86.66	13.33	16.66	14.44
6	الممرض + مستحضر الفطر *T. reesei* (T.r)	86.66	13.33	20	15.55
7	الممرض + مستحضر الفطرين (T.p) + (T.v)	96.66	3.33	6.66	4.44
8	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.v)	93.33	6.66	10	7.77
9	الممرض + مستحضر الفطرين (T.R) + (T.v)	93.33	6.66	13.33	8.88
10	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.p)	93.33	6.66	16.66	10
11	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.p)	90	10	16.66	12.22
12	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.ks)	93.33	6.66	13.33	8.88
13	الممرض + مستحضر الفطريات (T.ks) + (T.p) + (T.v)	96.66	3.33	6.66	4.44
14	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.p) + (T.v)	96.66	3.33	10	7.77
15	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.v)	96.66	3.33	6.66	4.44
16	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.p)	96.66	3.33	13.33	6.66
17	الممرض + المبيد الحيوي (FOUR.T)	100	0.00	3.33	3.33
	L.S.D 0.05	13.98	2.389	4.21	2.84

كل رقم يمثل ثلاث مكررا

T.v + F. brachygibbosum | *T.v + T.Ks + F. brachygibbosum*

T.V + T. P + T.Ks + F. brachygibbosum | (FOUR.T) المبيد + F. *brachygibbosum*

CONTROL | فقط *F. brachygibbosum*

الشكل(14) التأثير التآزري بين عزلات الفطر .spp *Trichoderma* المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في خفض نسبة وشدة الاصابة بالفطر *F.brachygibbosum* على بادرات القطن حقلياً .

بينت نتائج الجدول (20) ان أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسمين الفطريين Gliotoxin و Trichodermin لها تأثير معنوي كبير على معايير النمو لبادرات القطن مقارنة بنمو النبات عند إضافة الممرض*F.brachygibbosum* فقط من غير الفطر المقاوم فأثرت عزلات *Trichoderma* spp على صفة الوزن الخضري الطري والوزن الجاف وطول البادرة. إذ بلغ اعلى وزن خضري طري لبادرات القطن 6غم والوزن الخضري الجاف3غم وطول البادرة 38سم للتوليفة (FOUR.T) ، واقل وزن خضري طري 3غم ووزن خضري جاف 1غم والوزن الجذري الجاف 0.5غم وطول 29 سم للعزلة *T.koningiopsis*.

ويعزى تأثير عزلات الفطر *Trichoderma* spp. في معايير النمو لبادرات القطن وتحسينها بشكل كبير إلى تحفيز النبات على النمو من خلال تحرير المغذيات والمواد العضوية من التربة وزيادة امتصاص المعادن من قبل النبات. وفي دراسات أظهرت زيادة من معدلات إنبات البذور ، وحيوية الشتلات ، وخفض ظهور مسببات الأمراض التي تنقلها البذور ، وتقليل فقدان النبات مقارنة بالمعاملات غير الملقحة بالفطر *Trichoderma* spp. (Zheng و Shetty،2000وBharathوآخرون ،2006، و Prasadو Anes ،2008، و Mukhtarوآخرون،2012 ، وOsemwota وIsitekhale ، 2014). علاوة على ذلك ، فإن الأكسينات التي تنتجها *Trichoderma* قادرة على تحفيز النمو في النبات ونمو جذوره وجودة المحصول (Engelوآخرون ، 2001 ، Contrerasو cornejo وآخرون.2009).

جدول(20) دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في معايير بادرات القطنً المصابة بالفطر *F.brachygibbosum* تحت الظروف الحقلية

ت	المعاملات	الوزن الطري للبادرة (غم)	الوزن الجاف للمجموع الخضري	الوزن الجاف للمجموع الجذري	ارتفاع النبات (سم)
1	المقارنة Control (بدون اي اضافة)	5	2	1	35
2	اضافة الفطرالممرض فقط *F.brachygibbosum*	0.5	0.1	0.1	6
3	الممرض + مستحضر الفطر*T.viride* (T.v)	4	2	0.5	38
4	الممرض + مستحضر الفطر *T.pseudokoningii* (T.p)	4	1.5	1	34
5	الممرض + مستحضر الفطر *T.koningiopsis* (T.ks)	3	1	0.5	29
6	الممرض + مستحضر الفطر *T. reesei* (T.r)	4	2	0.75	36
7	الممرض + مستحضر الفطرين (T.p) + (T.v)	4	2	0.5	32
8	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.v)	4	2	0.5	36
9	الممرض + مستحضر الفطرين (T.R) + (T.v)	4	2	0.75	35
10	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.p)	3	1	0.5	33
11	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.p)	5	2.5	1	43
12	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.ks)	4	2	0.5	34
13	الممرض + مستحضر الفطريات (T.ks) + (T.p) + (T.v)	3	1	0.5	32
14	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.p) + (T.v)	4	2	0.75	34
15	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.v)	4	2	0.75	34
16	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.p)	4	2	0.5	33
17	الممرض + المبيد الحيوي (FOUR.T)	6	3	1	38
	L.S.D 0.05	2.53	2.16	1.098	3.86

كل رقم يمثل ثلاث مكررات

4-11-2: اختبار التأثير التآزري لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin مع المبيد الحيوي (FOUR.T) ضد الفطر *Alternaria alternata* تحت ظروف الحقل .

وأبدت أنواع الفطر *Trichoderma* spp عند استخدامها منفردة تأثير تضادي عالي ضد الفطر *Alternaria alternata* (جدول:21 ، 22 والشكل:13) فأعطت نسب انبات عالية فكانت اعلى نسبة 96.66% ونسبة تثبيط 3.33 للفطر *T. viride* تلاه الفطر *T. koningiopsis*. بنسبة انبات 90% ونسبة تثبيط 10% ،اما العزلتين *T.pseudokoningii* و *T. reesei* فان نسبة الانبات لهما 86.66% ونسبة التثبيط 13.33%. اما التوليفة التأزرية لعزلات الفطر المقاوم *Trichoderma* spp تميزت بمقدرة تضادية عالية ضد الفطر الممرض *Alternaria alternata* حيث كانت اعلى نسبة انبات 100%لتوليفة المستحضر الحيوي (FOUR.T) كما أعطت ست توليفات نسبة انبات عالية 96.66% ونسبة تثبيط 3.33% ، واقل نسبة انبات 90% ونسبة تثبيط 10% للتوليفة (*T.koningiopsis* و *T. reesei*).

وقد تعود القدرة التضادية للمقاوم الحيوي *Trichoderma* spp. إلى الاستعمار السطحي لهايفات المقاوم الحيوي أو عن طريق اختراقه المباشر لهايفات الفطر الممرض ، كما أنه قد تعود القدرة التضادية لهذا المقاوم الحيوي إلى افراز واحد أو اكثر من المضادات الحياتية مثل Trichodermin و Emodine و Gliotoxins وPachybascine والتي تعمل على تثبيط نمو الفطريات الممرضة (سعيد،2015) .

وأثبتت الدراسات ان التوليفة التأزرية لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. التي لاتبدي قدرة تضادية عند التداخل فيما بينها فانها تعزز إمكانية الفطر *Trichoderma* spp. في المقاومة الحيوية ضد العزلات الفطرية

جدول(21) اختبار التأثير التآزري بين عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في خفض نسبة وشدة الاصابة بالفطر الممرض *A.alternata* على بادرات القطن حقلياً .

ت	المعاملات	النسبة المئوية لانبات البذور	النسبة المئوية للتثبيط	النسبة المئوية للاصابة	النسبة المئوية لشدة الاصابة
1	**المقارنة Control (بدون اي اضافة)**	100	0.00	0.00	0.00
2	**اضافة الفطرالممرض فقط *A.alternata***	6.66	93.33	96.66	90
3	**الممرض + مستحضر الفطر(T.v) *T.viride***	96.66	3.33	6.66	4.44
4	**الممرض + مستحضر الفطر (T.p) *T.pseudokoningii***	86.66	13.33	23.33	18.88
5	**الممرض + مستحضر الفطر (T.ks) *T.koningiopsis***	90	10	16.66	12.22
6	**الممرض + مستحضر الفطر (T.r) *T. reesei***	86.66	13.33	20	15.55
7	**الممرض + مستحضر الفطرين (T.p) + (T.v)**	96.66	3.33	6.66	4.44
8	**الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.v)**	96.66	3.33	10	5.55
9	**الممرض + مستحضر الفطرين (T.R) + (T.v)**	96.66	3.33	13.33	6.66
10	**الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.p)**	93.33	6.66	16.66	10
11	**الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.p)**	93.33	6.66	20	11.11
12	**الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.ks)**	90	10	23.33	14.44
13	**الممرض + مستحضر الفطريات (T.ks) + (T.p) + (T.v)**	96.66	3.33	10	5.55
14	**الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.p) + (T.v)**	93.33	6.66	10	7.77
15	**الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.v)**	96.66	3.33	6.66	4.44
16	**الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.p)**	96.66	3.33	6.66	4.44
17	**الممرض + المبيد الحيوي (FOUR.T)**	100	0.00	0.00	0.00
	L.S.D 0.05	8.909	4.733	4.699	7.117

كل رقم يمثل ثلاث مكررات

T.p + A. alternata | *T .V+ T.P + A. alternate*

T.V + T.Ks + T.r + A. alternate | *+ A. alternate* المبيد(FOUR.T)

CONTROL | *A. alternate* فقط

الشـــكل (15) التـــأثير التـــآزري بـــين عـــزلات الفطـــر .spp *Trichoderma* المنتجـــة للســـم الفطـــريGliotoxin و Trichodermin فـــي خفـــض نســـبة وشـــدة الاصـــابة بـــالفطر الممـــرض *A.alternata* على بادرات القطن حقلياً .

كمـــا اثـــرت معـــاملات عـــزلات الفطـــر *Trichoderma* spp. علـــى معـــايير النمـــو لبـــادرات القطـــن المصـــابة بـــالفطر *A.alternata* (جـــدول:22) حيـــث تراوحـــت مـــن اعلـــى وزن خضـــري طـــري 6غـــم ووزن خضـــري جـــاف 2.5 غـــم ووزن جـــذري 1غـــم وطـــول 35ســـم لعـــزلات توليفـــة المستحضـــر الحيـــوي (FOUR.T) إلـــى اقـــل وزن خضـــري طـــري 3 ووزن خضـــري جـــاف 1 غـــم ووزن جـــذري 0.5غـــم وطـــول 31ســـم للعزلـــة ***T.viride*** .واتفقـــت النتـــائج مـــع دراســـة (الطـــائي،2021) ،ودراســـة اخـــرى بينـــت تـــأثير الفطـــرين T. *harzianum* و *T. koningii* منفـــردين ومجتمعـــين علـــى معـــايير النمـــو فـــي نبـــات الـــذرة إذ أظهـــرت تـــأثيرا معنويـــا فـــي زيـــادة عـــدد الأوراق وارتفـــاع الســـاق وطـــول الورقـــة ومســـاحتها وزيادة الانتاجية .(Worlu وآخرون،2022).

جـــدول(22) اختبـــار تـــأثير معاملـــة الفطـــر الممـــرض *A.alternata* وعـــزلات العامـــل الاحيـــائي .spp *Trichoderma* المنتجـــة للســـمين الفطـــري Gliotoxin و Trichodermin على معايير نمو بادرات القطن تحت ظروف الحقلية

ت	المعاملات	الوزنالطري للبادرة (غم)	الوزن الجاف للمجموع الخضري	الوزن الجاف للمجموع الجذري	ارتفاع النبات(سم)
1	المقارنة Control (بدون اي اضافة)	4	2	0.5	34
2	اضافة الفطرالممرض فقط	1	0.5	0.25	6
3	الممرض + مستحضر الفطر*T.viride* (T.v)	3	1	0.5	31
4	الممرض + مستحضر الفطر *T.pseudokoningii* (T.p)	4	2	0.75	34
5	الممرض + مستحضر الفطر *T.koningiopsis* (T.ks)	4	2	0.5	37
6	الممرض + مستحضر الفطر *T. reesei* (T.r)	3	1	0.5	37
7	الممرض + مستحضر الفطرين (T.p) + (T.v)	4	2	0.5	33
8	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.v)	4	2	0.7	32
9	الممرض + مستحضر الفطرين (T.R) + (T.v)	4	2	0.6	35
10	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.p)	3	2	0.5	33
11	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.p)	3	1	0.5	34
12	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.ks)	4	2	.0	36
13	الممرض + مستحضر الفطريات (T.ks) + (T.p) + (T.v)	4	2	0.5	35
14	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.p) + (T.v)	4	2	0.5	35
15	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.v)	4	2	0.5	34
16	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.p)	4	2	0.6	34
17	الممرض + المبيد الحيوي (FOUR.T)	6	2.5	0.75	35
	L.S.D 0.05	6.27	2.78	0.402	10.42

كل رقم يمثل معدل 3 مكررات

3-11-4: اختبار التأثير التآزري لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسمين الفطريين Trichodermin و Gliotoxin مع المبيد الحيوي (FOUR.T) ضد الفطر *Fsarium solani* تحت الظروف الحقلية

أظهرت نتائج اختبارات التأثير التآزري على الفطر الممرض *Fsarium solani* (جدول:23 ، 24 والشكل 14) ان اعلى نسبة انبات لعزلات الفطر *Trichoderma* spp منفردة 86.66% للعزلتين T.v و T.r ونسبة تثبيط 13.3%، في حين كانت نسبة الانبات 83.33% ونسبة تثبيط 16.66% للعزلتين T.p و T.ks ، اما عند استخدام الفطر *Trichoderma* spp كانت اعلى نسبة انبات 100% ونسبة تثبيط 0.00% لتوليفة المبيد الحيوي (FOUR.T) واقل نسبة انبات 90% ونسبة تثبيط 10% للتوليفتين (T.p+T.ks) و (T.p+Tr) وتراوحت نسب الانبات لباقي العزلات حيث كانت 96.66% للتوليفة (T.v +Tp +Tr) و (T.v + T.ks + Tr)، اما التوليفة (Tp + T.ks + Tr) فكانت نسبة الانبات فيها 93.33%.

واوضحت النتائج أيضا ان نسبة الإصابة وشدة المرض للفطر *F.solani* مع العامل الاحيائي إضافة الفطر *Trichoderma* spp إذ بلغت اعلى نسبة إصابة26% وشدة المرض 20% للعزلة *T.pseudokoningii*. واقل نسبة إصابة وشدة مرض 0.00% لتوليفة العزلات (FOUR.T). حيث التأثير التازري لعزلات الفطر المقاوم دعمت صفة المقاومة ضد الممرض بالتطفل المباشر على الممرض او بواسط السموم التي يفرزها الفطر *Trichoderma* spp. أضف إلى ذلك زيادة المقاومة لدى النبات ضد الممرضات واتفقت النتائج مع دراسة (البحراني،2021) التي اشارت كفاءة انواع مختلفة من الفطر *Trichoderma* spp. مع منتجاتها من سموم الفطر في تثبيط نمو العديد من المسببات الفطرية .

جدول(23) اختبار التأثير التآزري لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في خفض نسبة وشدة الاصابة بالفطر الممرض *F.solani* على بادرات القطن حقلياً .

ت	المعاملات	النسبة المئوية لانبات البذور	النسبة المئوية للتثبيط	النسبة المئوية للاصابة	النسبة المئوية لشدة الاصابة
1	المقارنة Control (بدون اي اضافة)	100	0.00	0.00	0.00
2	اضافة الفطرالممرض فقط	6.66	93.33	93.33	91.11
3	الممرض + مستحضر الفطر(T.v) *T.viride*	86.66	13.33	23.33	16.66
4	الممرض + مستحضر الفطر *T.pseudokoningii* (T.p)	83.33	16.66	26.66	20
5	الممرض + مستحضر الفطر *T.koningiopsis* (T.ks)	83.33	16.66	23.33	18.88
6	الممرض + مستحضر الفطر *T. reesei* (T.r)	86.66	13.33	20	15.55
7	الممرض + مستحضر الفطرين (T.p) + (T.v)	93.33	6.66	13.33	8.88
8	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.v)	93.33	6.66	16.66	10
9	الممرض + مستحضر الفطرين (T.R) + (T.v)	93.33	6.66	13.33	8.88
10	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.p)	90	10	20	13.33
11	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.p)	90	10	16.66	12.22
12	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.ks)	93.33	6.66	13.33	10
13	الممرض + مستحضر الفطريات (T.ks) + (T.p) + (T.v)	96.66	3.33	6.66	4.44
14	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.p) + (T.v)	96.66	3.33	6.66	4.44
15	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.v)	96.66	3.33	10	5.55
16	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.p)	93.33	6.66	16.66	10
17	الممرض + المبيد الحيوي (FOUR.T)	100	0.00	0.00	0.00
	L.S.D 0.05	18.70	3.39	3.34	5.69

كل رقم يمثل معدل 3 مكررات

T.V + F.solani

T.V + T. P + F.solani

T.V + T. P + T.Ks + F.solani

المبيد (FOUR.T) + *F.solani*

CONTROL

F.solani فقط

الشكل(16): تأثير عزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في خفض نسبة وشدة الاصابة بالفطر الممرض *F.solani* على بادرات القطن حقلياً .

بينمـا أظهـرت النتـائج فـي الجـدول(24) تـاثير عـزلات الفطـر *Trichoderma* spp. فـي زيـادة وزن النمـو الخضـري الطـري حيـث بلـغ اعلـى وزن طـري خضـري 6غـم ووزن خضــري جــاف 3غــم ووزن جــذري 1 وطــول 37ســم للتوليــف العــزلات الأربــع للفطــر Trichoderma spp. (FOUR.T) . واقـل وزن خضـري طـري 3غـم ووزن جـاف خضـري 1غـم ووزن جـذري جـاف 0.5غـم وطـول 34 سـم للعزلـة *T.viride* ،فـي حـين كان اقل طول للبادرة 31سم للعزلة.*T.pseudokoningii*

يسـاعد الفطـر *Trichoderma*مـن خـلال تطفلـه ومضـاداته الحيويـة وتنافسـه علـى الفضـاء والمغـذيات - فـي منـع نمـو مسـببات الأمـراض ولهـا تـأثير إيجـابي فـي نمـو النباتـات ، وخصوصـا المجمـوع الجـذري الخـاص بهـا ، الـذي يـؤثر ايجابـا فـي مقاومـة الجفـاف ،وقـد ثبـت أيضًـا أن فطـر *Trichoderma* يمكنهـا تحويـل سـموم الفيوزاريـوم إلـى مسـتقلبات جديدة يمكن أن تكون أقل سمية (Modrzewska وآخرون،2022).

جدول(24) اختبار التأثير التآزري لعزلات الفطر *Trichoderma* spp. المنتجة للسم الفطري Gliotoxin و Trichodermin في بعض معايير النمو لبادرات القطن والمصابة بالفطر الممرض *F.solani* تحت الظروف الحقلية .

ت	المعاملات	الوزن الطري للبادرة (غم)	الوزن الجاف للمجموع الخضري	الوزن الجاف للمجموع الجذري	ارتفاع النبات(سم)
1	المقارنة Control (بدون اي اضافة)	5	2	0.5	35
2	اضافة الفطرالممرض فقط	1	0.2	0.1	7
3	الممرض + مستحضر الفطر*T.viride* (T.v)	3	1	0.5	34
4	الممرض + مستحضر الفطر *T.pseudokoningii* (T.p)	4	2	0.75	31
5	الممرض + مستحضر الفطر *T.koningiopsis* (T.ks)	4	2	0.75	36
6	الممرض + مستحضر الفطر *T. reesei* (T.r)	3	1	0.5	35
7	الممرض + مستحضر الفطرين (T.p) + (T.v)	5	2	1	37
8	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.v)	5	2	1	42
9	الممرض + مستحضر الفطرين (T.R) + (T.v)	4	2	0.5	33
10	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.p)	5	2	1	41
11	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.p)	4	2	0.5	37
12	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.ks)	4	1.5	0.75	36
13	الممرض + مستحضر الفطريات (T.ks) + (T.p) + (T.v)	4	2	0.5	32
14	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.p) + (T.v)	5	2	1	40
15	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.v)	3	1	0.5	33
16	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.p)	3	1	0.6	31
17	الممرض + المبيد الحيوي (FOUR.T)	6	3	1	37
	L.S.D 0.05	2.27	1.46	0.806	7.23

كل رقم يمثل معدل 3 مكررات

وهـذه النتـائج قـد اتفقـت مـع دراسـات سـابقة فقـد أظهـرت عـزلات مـن الفطـر الأحيـائي *Trichoderma* spp. كفـاءة عاليـة فـي خفـض نسـبة وشـدة الأصـابة بـالفطر الممـرض وتحـت الظـروف الحقليـة وبصـورة مفـردة ممـا شـجع علـى أدخـال هـذه العوامـل مجتمعـة فـي بـرامج المكافحـة لحمايـة نبـات الـذرة الصـفراء مـن مـرض تعفـن الحبـوب والعـرانيص (الجبـوري وآخـرون ،2018). فـي حـين اثبـت فـي دراسـات سـابقة أن لاسـتخدام بعـض أنـواع الفطـر *Trichoderma* spp. مثـل *T. viride* و *T. harzianum* دوراً فعـالاً فـي مقاومـة الفطـرين *R.solani* و*M.phaseolina* وحمايـة بـذور الباميـا عنـد اسـتخدامهما بشـكل مفـرد و ازداد مثـل ذلـك التـأثير بشـكل معنـوي عنـد معاملـة البـذور بهـذين الفطـرين بشـكل متـداخل *T. viride* و *T. harzianum* , كمـا ادى ذلـك إلـى حصـول زيـادة واضـحة فـي مسـتوى بعـض الأنزيمـات مثـل Polyphenol Oxidaes ، Peroxidase ذات التـأثير الضـار المسـببات المرضـية (Howell و آخـرون, 2000 و اللشـي ,2013). فـي حـين درس كـل مـن عبيـد والجنـابي (2013) إمكانيـة تحفيـز مقاومـة نباتـات الخيـار ضـد الإصـابة بفطـر البيـاض الـدقيقي بواسـطة فطـر المكافحـة الحيويـة *T. harzianum* وقـد تبيّن أن سقي النباتـات براشـح فطـر المكافحـة الحيويـة أدى إلـى خفض تجرثم الفطـر *P. xanthii* علـى أوراق الخيـار إلـى حـوالي 53 % مقارنـة مـع معاملـة السـيطرة ، تـم اختبـار التـأثيرات المضـادة لعـزلات *Trichoderma* ضـد ثلاثـة أنـواع مـن الفطريـات الممرضـة *Sclerotinia* spp.، *F.oxysporum* ، *F. solani* .

12-4: اختبـار دور عـزلات الفطـر *Trichoderma* spp. والمبيـد الحيـوي (FOUR.T) فـي اسـتحثاث المقاومـة الجهازيـة فـي بـادرات القطـن ضـد مسـببات مـرض تعفن البذور وموت البادرات.

1-12-4: اختبار دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. والمبيد الحيوي (FOUR.T) في استحثاث المقاومة الجهازية في بادرات القطن ضد الفطر *A.alternata*

أظهـرت نتـائج الجـدول (25) ان عـزلات الفطـر *Trichoderma* spp بمـا فـي ذلـك التوليفـة التازريـة لعـزلات الفطـر *Trichoderma* spp لهـا تـأثير معنـوي فـي اسـتحثاث المكافحـة الجهازيـة فـي النباتـات ضـد الفطـر الممـرض *Alternaria alternata* قياسـا بمعاملـة المقارنـة (الفطـر الممـرض بمفـرده).حيـث سـجلت معاملـة المستحضـر الحيـوي (FOUR.T) اعلـى قيمـة للكلوروفيـل (وحـدة / غـم وزن طـري) 0.85 ، واعلـى فعاليـة

لانـزيم البيروكسـيديز 0.520 (وحـدة / غـم وزن طـري) ، وأعلـى قيمـة للفينـولات 0.46 (ملغـم / غـم للـوزن الطـري) لمعاملـة المستحضـر الحيـوي (FOUR.T) ضـد الفطـر الممـرض كـذلك بلغـت أعلـى فعاليـة لانـزيم بـولي فينـول اوكسـيديز 1.66 (وحـدة / غـم وزن طري) للتوليفة (FOUR.T) ضد الممرض.

وقد يعزى سبب ارتفاع فعالية انزيم البيروكسيديز بفعل فطر الاستحثاث *Trichoderma spp.* إلى ان النبات يستجيب للإصابة ونتيجة لهذه الاستجابة يتحفز النبات لاستحثاث المقاومة الجهازية فتظهر عوامل المقاومة ومنها البروتينات المتعلقة بالامراضية . اذ بينت الدراسات السابقة ان الفطر *Trichoderma* هو أحد العوامل الحيوية المفيدة التي تؤثر على صحة التربة وتعمل كسماد حيوي ، ومعالجة بيولوجية ، وامتصاص العناصر الغذائية ، ومحفز نمو النبات ، ومقاومة الضغوط غير الحيوية ، وزيادة إنتاجية المحاصيل. *Trichoderma* spp.هو استعمار في الجذور وذو كفاءة عالية في استعمال النيتروجين وإزالة السموم من المناطق الملوثة في منطقة الجذور ، حيث يتم تبادل الإشارات مع الفطر *Trichoderma* عند اقترانه مع جذور النبات ، يؤدي إلى إحداث مقاومة جهازية ويزيد من امتصاص النبات للمغذيات. يعزز *Trichoderma* نمو النبات وتطوره ومقاومته مما يزيد من غلة المحاصيل. تحفيز تفرع الجذر وزيادة الكتلة الحيوية للنبات بواسطة سلالات *Trichoderma* يرجع إلى مركبات تشبه الأكسين الفطري. *Trichoderma* spp فعال ضد الفطريات المسببة للأمراض التي تنتقل عن طريق التربة.(Bahadur ،2022). حيث يعتبر الفطر *Trichoderma* spp من الفطريات المعززة لنمو النبات التي تنتج الهرمونات النباتية وإنزيم 1-(ACC) aminocyclopropane-1-carboxylate.(Tyśkiewicz وآخرون،2022).

وفي دراسة حديثة اثبتت عند اضافة الفطر *Trichoderma* إلى نبات الطماطة المصابة بالفيروس (TMV) لوحظ زيادة في محتوى الكلوروفيل الكلي. بالمقارنة مع نباتات الطماطة غير المعالجة (Nawrocka وآخرون،2022)

جـدول(25) دور عـزلات الفطـر *Trichoderma spp.* والمبيـد الحيـوي (FOUR.T) في استحثاث المقاومة الجهازية في بادرات القطن ضد الفطر *A.alternata*.

ت	المعاملات	الكلورفيل	البولي فينيل اوكسديز PPO	البيروكسيديز POD	الفينولات ملغم / غم وزن طري
1	المقارنة Control (بدون اي اضافة)	0.78	1.40	0.430	0.27
2	اضافة الفطرالممرض فقط	0. 42	1.43	0.331	0.32
3	الممرض + مستحضر الفطر(T.v) *T.viride*	0.72	1.49	0.390	0.37
4	الممرض + مستحضر الفطر (T.p) *T.pseudokoningii*	0.75	1.49	0.384	0.34
5	الممرض + مستحضر الفطر *T.koningiopsis* (T.ks)	0.78	1.45	0.403	0.32
6	الممرض + مستحضر الفطر (T.r) *T. reesei*	0.74	1.50	0.394	0.36
7	الممرض + مستحضر الفطرين (T.p) + (T.v)	0.81	1.58	0.474	0.38
8	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.v)	0. 80	1.53	0.482	0.39
9	الممرض + مستحضر الفطرين (T.R) + (T.v)	0.79	1.49	0.497	0.42
10	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.p)	0.81	1.52	0.433	0.41
11	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.p)	0.79	1.55	0.466	0.42
12	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.ks)	0.79	1.50	0.429	0.43
13	الممرض + مستحضر الفطريات (T.ks) + (T.p) + (T.v)	0.83	1.64	0.454	0.40
14	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.p) + (T.v)	0.84	1.63	0.464	0.43
15	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.v)	0.82	1.57	0.455	0.43
16	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.p)	0.82	1.59	0.488	0.44
17	الممرض + المبيد الحيوي (FOUR.T)	0.85	1.66	0.520	0.46
	L.S.D 0.05	0.044	0.204	0.0165	0.043

كل رقم يمثل ثلاث مكررات

4-12-2: اختبار دور عزلات الفطر *Trichoderma* spp. والمبيد الحيوي (FOUR.T) في استحثاث المقاومة الجهازية في بادرات القطن ضد الفطر *F.solani*

اظهرت النتائج كفاءة عزلات الفطر *Trichoderma* spp. والمبيد الحيوي (FOUR.T) في استحثاث المكافحة الجهازية في النباتات ضد الفطر الممرض *F.solani* الجدول (26) فقد كانت أعلى قيمة للكلوروفيل 0.86 (وحدة / غم وزن طري) ، واعلى تركيز لانزيم البيروكسيد 0.528 (وحدة / غم وزن طري)، واعلى قيمة في الفينولات 0.46 (ملغم / غم للوزن الطري) ، واعلى تركيز لانزيم البولي فينول اوكسيديز 1.65 (وحدة / غم وزن طري) لتوليفة المبيد الحيوي (FOUR.T) ضد الفطر الممرض *F.solani*.

وكانت النتائج مطابقة لدراسة تم فيها تقييم كفاءة عزلات مختلفة من الفطر *Trichoderma* spp ضد الفطريات الممرضة للنبات.واظهرت فاعلية كبيرة في استحثات المقاومة الجهازية بالنباتات ضد المسببات المرضية وذلك بفعل زيادة فعالية بعض الانزيمات المسؤولة عن الاستحثاث (البحراني،2021). كما أجريت دراسة في تقييم كفاءة استحثاث العامل الاحيائي *T.harzianum* والعامل الكيميائي حامض الساليسيليك في المقاومة باستعمال آليات استحثاث المكافحة الجهازية ، اذ اظهرت كفاءة الاستحثاث في زيادة مؤشرات النمو الخضرية والإنتاجية للنبات .(حسن و القيسي ،2019).

جـدول(26) دور عـزلات الفطـر *Trichoderma spp.* والمبيـد الحيـوي (FOUR.T) في استحثاث المقاومة الجهازية في بادرات القطن ضد الفطر *F.solani*

ت	المعاملات	الكلورفيل	البولي فينول اوكسديز PPO	البيروكسيديز POD	الفينولات ملغم/غم وزن طري
1	**المقارنة Control (بدون اي اضافة)**	0.78	1.40	0.430	0.27
2	**اضافة الفطرالممرض فقط**	0. 41	1.43	0.322	0.30
3	**الممرض + مستحضر الفطر*T.viride* (T.v)**	0.74	1.47	0.393	0.38
4	**الممرض + مستحضر الفطر *T.pseudokoningii* (T.p)**	0.75	1.49	0.383	0.35
5	**الممرض + مستحضر الفطر *T.koningiopsis* (T.ks)**	0.75	1.45	0.434	0.32
6	**الممرض + مستحضر الفطر *T. reesei* (T.r)**	0.76	1.52	0.384	0.37
7	**الممرض + مستحضر الفطرين (T.p) + (T.v)**	0.84	1.56	0.464	0.34
8	**الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.v)**	0. 82	1.53	0.482	0.38
9	**الممرض + مستحضر الفطرين (T.R) + (T.v)**	0.79	1.29	0.458	0.42
10	**الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.p)**	0.82	1.55	0.437	0.45
11	**الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.p)**	0.80	1.56	0.459	0.42
12	**الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.ks)**	0.79	1.52	0.456	0.45
13	**الممرض + مستحضرالفطريات (T.ks) + (T.p) + (T.v)**	0.81	1.62	0.444	0.40
14	**الممرض + مستحضرالفطريات (T.r) + (T.p) + (T.v)**	0.84	1.62	0.464	0.43
15	**الممرض + مستحضرالفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.v)**	0.82	1.54	0.455	0.42
16	**الممرض + مستحضرالفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.p)**	0.83	1.58	0.480	0.45
17	**الممرض + المبيد الحيوي (FOUR.T)**	0.86	1.65	0.528	0.46
	L.S.D 0.05	0.057	0.095	0.072	0.074

كل رقم يمثل معدل 3مكررات

3-12-4: اختبار دور عزلات الفطر *Trichoderma spp.* والمبيد الحيوي (FOUR.T) في استحثاث المقاومة الجهازية في بادرات القطن ضد الفطر *F.brachygibbosum*

اظهرت النتائج كفاءة عزلات الفطر *Trichoderma spp.* والمبيد الحيوي (FOUR.T) في استحثاث المقاومة الجهازية في بادرات القطن ضد الفطر *F.brachygibbosum* ، اذ بينت النتائج (جدول 27) ان اعلى قيمة للكلورفيل 0.86 (وحدة / غم وزن طري)، واعلى تركيز لانزيم البيروكسيد 0.528 (وحدة / غم وزن طري)، واعلى قيمة للفينولات 0.46 (ملغم / غم للوزن الطري) ، وكان اعلى تركيز لانزيم البولي فينول اوكسيديز 1.65 (وحدة / غم وزن طري) لتوليفة العزلات في المستحضر الحيوي (FOUR.T).

حيث اكدت الدراسات السابقة كفاءة اجناس الفطر *Trichoderma spp.* في استحثاث المقاومة الجهازية في النباتات، فقد اثبت Kilonziوآخرون(2020) ان الفطر *T. asperellum* له كفاءة عالية في السيطرة على مرض اللفحة المتاخرة على الطماطة من خلال تحفيز المقاومة الجهازية في النبات و زيادة محتواه في الفينولات و حامض السالسليك و تحفيز فعل الانزيمات مثل Peroxidase و Oxidase و Lipoxygenase (Mohamed و آخرون، 2020 و الاسدي ، 2020).

جـدول(27) اختبـار دور عـزلات الفطـر *Trichoderma spp.* والمبيـد الحيـوي (FOUR.T) فـي اسـتحثاث المقاومـة الجهازيـة فـي بـادرات القطـن ضـد الفطـر *F.brachygibbosum*

ت	المعاملات	الكلورفيل	البولي فينول اوكسديز PPO	البيروكسيديز POD	الفينولات ملغم /غم وزن طري
1	المقارنة Control (بدون اي اضافة)	0.78	1.40	0.430	0.27
2	اضافة الفطرالممرض فقط *F.brachygibbosum*	0. 42	1.43	0.332	0.32
3	الممرض + مستحضر الفطر(T.v) *T.viride*	0.76	1.45	0.384	0.38
4	الممرض + مستحضر الفطر (T.p) *T.pseudokoningii*	0.74	1.52	0.393	0.38
5	الممرض + مستحضر الفطر *T.koningiopsis* (T.ks)	0.75	1.47	0.434	0.32
6	الممرض + مستحضر الفطر (T.r) *T. reesei*	0.75	1.49	0.383	0.35
7	الممرض + مستحضر الفطرين (T.p) + (T.v)	0.80	1.55	0.459	0.42
8	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.v)	0.79	1.56	0.456	0.45
9	الممرض + مستحضر الفطرين (T.R) + (T.v)	0.84	1.29	0.464	0.34
10	الممرض + مستحضر الفطرين (T.ks) + (T.p)	0.82	1.52	0.437	0.45
11	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.p)	0. 82	1.56	0.482	0.38
12	الممرض + مستحضر الفطرين (T.r) + (T.ks)	0.79	1.53	0.458	0.42
13	الممرض + مستحضر الفطريات (T.ks) + (T.p) + (T.v)	0.82	1.54	0.455	0.42
14	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.p) + (T.v)	0.83	1.62	0.480	0.45
15	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.v)	0.81	1.58	0.444	0.40
16	الممرض + مستحضر الفطريات (T.r) + (T.ks) + (T.p)	0.84	1.61	0.464	0.43
17	الممرض + المبيد الحيوي (FOUR.T)	0.86	1.65	0.528	0.46
	L.S.D 0.05	0.029	0.046	0.0239	0.068

كل رقم يمثل ثلاث مكررات

5- الاستنتاجات والتوصيات

5-1: الاستنتاجات

1- أظهرت نتائج العزل والتشخيص المظهري وجود 25 عزلة مرضية عزلت من البذور المتعفنة والبادرات الميتة لمحصول القطن، بينما أظهر اختبار القدرة الامراضية لهذه العزلات المرضية ان ثلاث عزلات منها ذات ضراوة امراضية عالية وحسب التشخيص الجزيئي فأنها تعود للانواع (*F.solani* و *F.brachygibbosum* و *A.alternata*).

2- قدرة عزلات الفطر الاحيائي *Trichoderma sp* المنتخبة على انتاج السمين الفطريين Trichodermin وGliotoxin وكذلك قدرتها على تكوين الاجسام الحجرية من انواع مختلفة للفطر *Trichoderma spp* على الوسط السائل بعد تعرضه إلى ظروف اجهاد مختلفة وامتلاكهما قدرة تثبيط عالية ضد المسببات المرضية .

3- اظهرت عزلات الفطر *Trichoderma* spp وتوليفاتها كانت ذات تأثيراً معنوي على نسبة الانبات وموت البادرات على نبات القطن في الاصص البلاستيكية واثرت على اغلب معايير النمو والمبيد الحيوي (FOUR.T) المصنع من العزلات المتوافقة في مكافحة العديد من مسببات امراض النبات .

4- قدرة العوامل الحيوية في تحفيز المقاومة الجهازية في النبات وذلك زيادة فعالية انزيمي البيروكسيديز (POD) والبولي فينول اوكسيديز (PPO) وتركيزالمركبات الفينولية

2-5: التوصيات

1-استخدام المبيد الحيوي (FOUR.T) للفطر *Trichoderma* spp والمدعم بالاجسام الحجرية والسموم الفطرية (المضادات الحيوية) في مكافحة العديد من مسببات امراض النبات.

2- تقييم المبيد الحيوي (FOUR.T) المصنع من الفطر *Trichoderma* spp في هذه الدراسة في مكافحة مسببات مرضية أخرى وعلى عوائل نباتية مختلفة .

3- اجراء تجارب المبيد الحيوي (FOUR.T) المصنع من الفطر *Trichoderma* spp لدراسة تأثيرها على معايير نمو النبات.

4-اجراء مزيد من الدراسات لفهم العواقب الصحية لسموم فطر *Trichoderma* ومستقلباته عند التعرض المزمن لها وتأثيراته على الانسان والحيوان.

6: المصادر

6-1: المصادر العربية

الأحمد، ماجد ونذير موصلي.(1987).مرض ذبول وتعفن جذور العدس. نشرة علمية 14 : 27-31.

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

العامري،علاء طالب سالب،(2021).التشخيص الجزيئي للبكتريا المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في محافظتي كربلاء وبابل ومقاومتها باستعمال بعض العوامل الاحيائية والمركبات النانوية،رسالة ماجستير،كلية الزراعة/جامعة كربلاء/العراق.

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

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

البحراني ، شهد علي محمد.(2021). التشخيص الجزيئي لبعض عزلات الفطر الاحيائي Trichoderma spp. المعزولة من محافظات العراق والمنتجة للسم الفطري Gliotoxin وتقويم فعاليته ضد بعض مسببات امراض نبات الخيار. رسالة ماجستير، كلية الزراعة ـ جامعة كربلاء / العراق.

البلداوي، عبد الستار وسعد الدين شمس الدين وعفاف جواد ووداد حسن.(1989). مقاومة مرض موت بادرات القطن والباميا المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* Kuhn ببعض المبيدات. مجلة البصرة للعلوم الزراعية 2:157-163.

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

جبر، كامل سلمان وخالد عبدالرزاق حبيب. (1986). الخسائر الناجمة عن موت بادرات القطن وكيفية الوقاية منها. مجلة تقني. 6 (3و4): 100-103.

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

الجبوري، صبا باقر عبد خلف.(1998). اللقاح البكتيري *Pseudomonus fluorescens* على محصول القطن : الاستجابة والمقاومة الحيوية لمرض الخناق *Rhizoctonia solani* Kuhn . رسالة ماجستير، كلية الزراعة ـ جامعة بغداد - العراق . 99 صفحة.

الجعيفري، وسام عدنان راضي(2006). عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لبذور الرز المعاملة بالفطر Trichoderma harazianum Rafai تحت مستويات رطوبية مختلفة وتأثيرها في انبات البذور ونمو البادرات. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة الكوفة، العراق

جنيط ،محمد كريم. (2021). تحليل جغرافي للتغير المناخي في تغير محصول القطن في محافظة واسط . مجلة لارك,(41)*2*، 1059–1093 .

الجهاز المركزي للإحصاء .(2020). تقرير أنتاج القطن والذرة الصفراء والبطاطا. مديرية الإحصاء الزراعي . وزارة الزراعة، جمهورية العراق.

الحداد،انفال مكي صاحب (2021).التشخيص المظهري والجزيئي لمسبب مرض التبقع الالترناري على الزيتون وتعزيز المقاومة باستخدام بعض العوامل الحيوية والاسمدة العضوية ، رسالة ماجستير ،جامعة الكوفة كلية الزراعة ،قسم وقاية النبات،العراق.

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

حسن، عبد الله عبد الكريم، والدوري ، لينا قاسم محمد.(2018). عزل وتنقية البروتينات المضادة للفطريات من عزلات فطرية متنوعة وتقييم كفاءتها داخل وخارج الجسم الحي . وقائع المؤتمر الدولي الأول والعلمي الثالث لكلية العلوم – جامعة تكريت. 17-18.

حسن، فائزة صالح.(1985). الفطريات المصاحبة لبذور بعض المحاصيل الزيتية وتأثيرها على الانبات . رسالة ماجستير، كلية الزراعة ـ جامعة بغداد / العراق.

حسن، محمد صادق.(1989). استخدام الطاقة الشمسية في بسترة الترب الزراعية بالعراق. مجلة وقاية النبات العربية 7: 122-125.

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

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

زيود، عمار وفيق .(2009).تأثير أنواع السماد العضوي ومواعيد اضافتها في صفات نمو وإنتاج صنف القطن حلب/33-1/ونوعية اليافه في ظروف منطقة الغاب. رسالة ماجستير، قسم المحاصيل الحقلية ، كلية الهندسة الزراعية، جامعة تشرين،سوريا.

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

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

شاه الدين، سهام عبد الله ادم ،انتصاريوسف احمد.(2020).العوامل المؤثرة على انتاج الدخن بولاية شمال دارفور. جامعة السودان للعلوم والتكنولوجيا

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

الطائي ،سعد أحمد علوان.(2021). دراسة العلاقة بين مستوى انتاج الـ Trichodermin ومقدرة الفطر *Trichoderma* sp على مقاومة مسببات موت بادرات نبات الباميا وتأثير منظمات النمو عليها. رسالة ماجستير، كلية الزراعة ـ جامعة كربلاء / العراق.

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

الطوفان، نور كاظم ناصر.(2020).عزل وتشخيص الفطريات المسببة لمرض تعفن الساق والعرانيص الفيوزارمي في الذرة الصفراء وتقييم فاعلية بعض الأصناف والعوامل الاحيائية في مكافحتها ومنعها من انتاج السم الفطري Fumonisin. رسالة ماجستير، كلية الزراعة - جامعة كربلاء / العراق.

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

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

عبدالواحد، اياد. (1996). تطبيق تقنية التلقيح البكتيري بال *Pseudomonus fluorescens* على نبات الرز وتأثيرها على القدرة الانتاجية. مجلة اباء للأبحاث الزراعية . 6 (1).

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

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

عمرو سيد صوفى. (2021). دراسة تحليلية لأثر السياسة الزراعية على محصول القطن فى مصر (دراسة حالة محافظة الفيوم) *Journal of Agricultural Economics and* . *Social Sciences*, *12*(12), 1129-1140. *لارك*, *2*(41), 1093-1059 ,

قاسم، نبيل عزيز وخالد حسن طه وعصام عبدالستار. (1989). تأثير عدة تراكيز من كلوريد الصوديوم في فطريات مسببه لمرض موت بادرات الطماطة. مجلة زراعة الرفدين.21: 343-352.

القيسي، عبير رؤووف محمود ، حسن، عبد الله عبد الكريم وصالح، وليد محمد.(2019). تقييم كفاءة استحثاث المقاومة الجهازية لأصناف من الحنطة العراقية بأستخدام الحث الاحيائي والكيميائي لمقاومة مرض تعفن الجذور المتسبب عن الفطر الممرض Rhizoctonia solani. المؤتمر العلمي الوطني الثالث،13-14 اذار،2019.ص:98-115.

القيسي، فادية فؤاد .(2010).استجابة القطن والادغال المرافقة لمعاملات المكافحة والكثافة النباتية. رسالة ماجستير، قسم علوم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة بغداد. ع. ص.93.

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

اللشي، نجوى بشير شمعون. (1999). أمراض جذور البازلاء الفطرية ومقاومتها. رسالة ماجستير، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل ـ العراق .

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

محمد، نضال يونس.(1994). المقاومة المتكاملة لموت بادرات وتعفن جذور البنجر السكري . رسالة ماجستير، كلية الزراعة والغابات ، جامعة الموصل ـ العراق.

- **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).

2-6: المصادر الاجنبية

Abbas, H., Wahid, M. A., Sattar, A., Tung, S. A., Saleem, M. F., Irshad, S., ... and Li, Y. (2022). Foliar application of mepiquat chloride and nitrogen improves yield and fiber quality traits of cotton (Gossypium hirsutum L.). *Plos one*, *17*(6), e0268907.

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

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

Al-Ani, L. K. T. (2019). Bioactive secondary metabolites of Trichoderma spp. for efficient management of phytopathogens. In *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms* (pp. 125-143). Springer, Singapore.

Al-Esawee, T. A. A. W., and AL-Taae, A. K. M. (2016). Effects of two biological agents Trichoderma harzianum and T. viride in control of gray mold disease in tomato and eggplant under greenhouse condition. ANBAR JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES, 14(2).

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

Aljallad, R.(2022). First report of *Alternaria alternata* Keissler causing leaf spot on Rhus coriarial in Syria**.**Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (44) No. (3)

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

AL-Omran, A., Eid, S., and Alshammari, F. (2019). Crop water requirements of date palm based on actual applied water and Penman–Monteith calculations in Saudi Arabia. *Applied water science*, *9*(4), 1-9.

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

Alwan, A. M., Wali, L. A., & Yousif, A. A. (2018). Optimization of AgNPs/mesoPS active substrates for ultra–low molecule detection process. *Silicon*, *10*(5), 2241-2251.

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

Anke, H., and Laatsch, H. (2018). Cyclic peptides and depsipeptides from fungi. In *Physiology and Genetics* (pp. 331-365). Springer, Cham.

Ansari, P., Rehman, A. U., Pitir, F., Veziroglu, S., Mishra, Y. K., Aktas, O. C., & Salamci, M. U. (2021). Selective laser melting of 316l austenitic stainless steel: Detailed process understanding using multiphysics simulation and experimentation. *Metals*, *11*(7), 1076.

Arumugam, T., Simeone, D. M., Van Golen, K., & Logsdon, C. D. (2005). S100P promotes pancreatic cancer growth, survival, and invasion. *Clinical Cancer Research*, *11*(15), 5356-5364.

Asad, S. A. (2022). Mechanisms of action and biocontrol potential of Trichoderma against fungal plant diseases-A review. *Ecological Complexity*, *49*, 100978‹12.

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

Ayad, A., Farag, H. E., Youssef, A., & El-Saadany, E. F. (2018, February). Detection of false data injection attacks in smart grids using recurrent neural networks. In *2018 IEEE power & energy society innovative smart grid technologies conference (ISGT)* (pp. 1-5). IEEE.

Bacharis, M., Coppins, M., and Allen, J. E. (2010). Dust in tokamaks: An overview of the physical model of the dust in tokamaks code. *Physics of Plasmas*, *17*(4), 042505.

Bahadur, A. (2022). *Trichoderma*: A Unique Bio-control Agent Boost up Plants Immunity. Advances. Vol. 3, No. 3, 2022, pp. 42-48. doi: 10.11648/j.advances.20220303.11

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

Bangar, S.P., Sharma, N., Bhardwaj, A. and Phimolsiripol, Y., 2022. Lactic acid bacteria: a bio-green preservative against mycotoxins for food safety and shelf-life extension. Quality Assurance and Safety of Crops and Foods 14: 13–31. https://doi.org/10.15586/ qas.v14i2.1014

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

Bell, D. E. (1982). Regret in decision making under uncertainty. *Operations research*, *30*(5), 961-981..

Benítez, T.; Rincón, M.A.; Limón, C.M.; Codón, C.A.(2004) Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. Int. Microbiol., 7, 249–260.

Benson, D. A. I, Karsch-Mizrachi, DJ Lipman, J. Ostell, and DL Wheeler. 2005.“GenBank.”. Nucleic Acids Research, 33.

Bharath, B. G., Lokesh, S., Prakash, H. S. and Shetty H. S. (2006). Evaluation of different plant protectants against seed mycoflora of watermelon (Citrullus lanatus). Research Journal of Botany. 16: 1-5.

Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, *18*(5), 355-383.

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

Bills, G. F., and Gloer, J. B. (2017). Biologically active secondary metabolites from the fungi. *The fungal kingdom*, 1087-1119.

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

Blandino, A., Macıas, M., & Cantero, D. (2001). Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, *36*(7), 601-606.

Błaszczyk, J. W., & Orawiec, R. (2011). Assessment of postural control in patients with Parkinson's disease: sway ratio analysis. *Human movement science*, *30*(2), 396-404.

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.

Bradley, C. A., Allen, T. W., Sisson, A. J., Bergstrom, G. C., Bissonnette, K. M., Bond, J., ... & Wise, K. A. (2021). Soybean yield loss estimates due to diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2015 to 2019. *Plant Health Progress*, *22*(4), 483-495.

Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(1), 21-32.

Burges, H.D. and Keith, A.J. (1998). Technology of formulation and application. Formulation of microbial biopesticides. London. 7 - 30.

Carberry, S., Molloy, E., Hammel, S., O'Keeffe, G., Jones, G. W., Kavanagh, K., and Doyle, S. (2012). Gliotoxin effects on fungal

growth: mechanisms and exploitation. Fungal Genetics and Biology, 49(4), 302-312.

Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., ... & Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery*, *2*(5), 401-404.

Chakrapani, K., Sinha, B., Chanu, W. T., Chakma, T., and Thangja, B. (2022). Morphological and molecular variability studies of *Rhizoctonia solani* isolates of Manipur (India) inciting sheath blight in rice (Oryza sativa. L).

Chandra, P. (2019). Fungal community for novel secondary metabolites. In *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi* (pp. 249-283). Springer, Cham.

Chehri, K., Salleh, B., and Zakaria, L. (2015). Morphological and phylogenetic analysis of *Fusarium solani* species complex in Malaysia. *Microbial ecology*, *69*(3), 457-471.

Chen, S., Daly, P., Zhou, D., Li, J., Wang, X., Deng, S., ... and Druzhinina, I. S. (2022). The use of mutant and engineered microbial agents for biological control of plant diseases caused by *Pythium*: Achievements versus challenges. *Fungal Biology Reviews*.

Chet, I.; Inbar, J.; Hadar, I.(1997) .Fungal antagonists and mycoparasites. In The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships; Wicklow, D.T., Söderström, B., Eds.; Springer: Berlin, Germany. pp. 165–184.

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

Christenson, H. K., & Claesson, P. M. (1988). Cavitation and the interaction between macroscopic hydrophobic surfaces. *Science*, *239*(4838), 390-392.

Chu, B., Zhou, X., Ren, K., Neese, B., Lin, M., Wang, Q., ... & Zhang, Q. (2006). A dielectric polymer with high electric energy density and fast discharge speed. *Science*, *313*(5785), 334-336.

Cole, R. J., and Cox, R. H. (1981). Handbook of Toxic Fungal Metabolites I. NewYork, NY: Academic Press.

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

Collemare, J., and Lebrun, M. H. (2011). Fungal secondary metabolites: ancient toxins and novel effectors in plant–microbe interactions. *Effectors in plant-microbe interactions*, 377-400.

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

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodriguez, L., Cortés-Penagos, C. and López-Bucio, J. (2009). Trichoderma virens, a Plant Benefcial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root

Growth through an Auxin-Dependent. Plant Physiology. 149(3):1579–1592.

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

Contreras- Cornejo, H. A., Macías- Rodríguez, L., Real- Santillán, R. O., López- Carmona, D., García- Gómez, G., Galicia- Gallardo, A. P.; and Larsen, J. (2021). In a belowground multitrophic interaction, Trichoderma harzianum induces maize root herbivore tolerance against Phyllophaga vetula. *Pest Management Science*, *77*(9), 3952-3963.

Cook, R. J., and Baker, K. F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society..

Cordoza, A. R. (2011). Forensic dentistry investigation protocol. *Brower MC. Forensic dental evidence an investigator'handbook. 2nd ed. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Fransisco, Singapore, Sidney, Tokyo: Academic Press Elsevier*, 73-92.

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.

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

Daoubi, M., Pinedo-Rivilla, C., Rubio, M. B., Hermosa, R., Monte, E., Aleu, J., and 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.

Dawoud, T.M., Yassin, M.A., El-Samawaty, A.R.M., Elgorban, A.M. (2021) Silver nanoparticles synthesized by Nigrospora oryzae showed antifungal activity. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(3), 1847-1852

Degenkolb, T., Dieckmann, R., Nielsen, K. F., Gräfenhan, T., Theis, C., Zafari, D., ... and Samuels, G. J. (2008). The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. Mycological Progress, 7(3), 177-219.

Delgado-Jarana J, Pintor-Toro JA, Benítez T (2000) Overproduction of β-1,6-glucanase in Trichoderma harzianum is controlled by extracellular acidic proteases and pH. Biochim Biophys Acta 1481:289-296

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

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

Duan, C. X., Wang, B. B., Sun, F. F., Yang, Z. H., Zhu, Z. D., and Wang, X. M. (2020). Occurrence of Maize Ear Rot Caused by *Fusarium fujikuroi* in China. *Plant Disease*, *104*(2):587-587.

Engel, R. E., Bruebaker, P. L., and Ornberg T. J. (2001). A chloride deficient leaf spot of WB881 Durum. American Journal of Soil Science Society. 65:1448-1454

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

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

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

Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol.

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

Gisi, U. (2022). Crossover between the control of fungal pathogens in medicine and the wider environment, and the threat of antifungal resistance. *Plant Pathology*, *71*(1), 131-149.

Godtfredsen, W. O., and Vangedal, S. (1964). Trichodermin new antibiotic related to trichothecin. Proceedings of the chemical society of london, (JUN), 188.

Goulart, A.C.P. Reação de cultivares de algodoeiro a *Rhizoctonia solani* na fase de plântula e benefícios do tratamento de sementes com fungicidas. Summa Phytopathologica, Botucatu, v.42, n.4, p.308-312, 2016**.**

Guilger-Casagrande, M., Germano-Costa, T., Pasquoto-Stigliani, T., Fraceto, L. F., & Lima, R. D. (2019). Biosynthesis of silver nanoparticles employing Trichoderma harzianum with enzymatic stimulation for the control of Sclerotinia sclerotiorum. *Scientific reports*, *9*(1), 1-9.

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

Harman, D. (1991). The aging process: major risk factor for disease and death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(12), 5360-5363.

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

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

Howell, C. R. (2002). Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, *92*(2), 177-180.

Howell,C.R.;Hanson,L.E.;Stipanovic,R.D.andPuckhaber,L.S.(2000). Induction of terpenoid synthesis in Cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with Trichoderma verns. Phytopathology.90:248-252

Hu, Y. J., Yang, H. M., Jin, J., Yan, H. H., Wang, J. P., & Zhang, R. Q. (2022). Synergistic activity of antagonistic Trichoderma spp. and Rhizoctonia solani increases disease severity on strawberry petioles. *European Journal of Plant Pathology*, *164*(3), 375-389.

Huang, S.L. ; Kohmoto, K. ; Otani, H. ; Kodama, M. 1996 . Nuclear behavior during the formation ofapressoriaby Alternaria alternata. Myco. Sci., 37, 41-47

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

Iradukunda, L., Wang, Y. P., Nkurikiyimfura, O., Wang, T., Yang, L. N., and Zhan, J. (2022). Establishment and Application of a Multiplex PCR Assay for the Rapid Detection of Rhizoctonia solani Anastomosis Group(AG)3PT,the Pathogen Causing Potato Black Scurf and Stem Canker. *Pathogens*, *11*(6), 627.

Isitekhale, H. H. E., & Osemwota, I. O. (2014). Poultry manure and nitrogen–phosphorus–potassium fertilizer application and their residual effects on soil physical properties in two distinct ecological

zones of Central Southern Nigeria. *Communications in soil science and plant analysis*, *45*(21), 2721-2733.

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, M. A., Mascarin, G. M., and Kobori, N. N. (2017). *U.S. Patent No. 9,642,372*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

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

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

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

Kappelman,A.J. 1982. Resistance to *Fusarium* with pathogen in currently used cotton cultivars. Plant Dis. 66: 837-839 .

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

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

Keller, N. P. (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(3), 167-180.

Keswani, C., Singh, H. B., Hermosa, R., García-Estrada, C., Caradus, J., He, Y. W., ... and Sansinenea, E. (2019). Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. *Applied microbiology and biotechnology*, *103*(23), 9287-9303.

Khalilia, E., M.A. Javeda, F. Huyop, S. Rayatpanahb, S. Jamshidi and R. Abdul Wahab.(2016). Evaluation of *Trichoderma* isolates as potential biological control agent against soybean charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina*. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 30: 479-488.

Khan, N., Han, Y., Wang, Z., Wang, G., Feng, L., Yang, B., and Li, Y. (2019). Role of proper management of nitrogen in cotton growth and development. *International Journal of Biosciences*, *14*(5), 5.

Khan, R. A. A., Najeeb, S., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Li, Y., and Xie, B. (2020). Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic bacteria and Root-knot nematode. Microorganisms, 8(3), 401.

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

Kimura, N. ; Tsuge, T. 1993 . Genecluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. J. Bacteriol., 175, 4427-4435

Kobori, N. N., Mascarin, G. M., Jackson, M. A., and Schisler, D. A. (2015). Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal biology*, *119*(4), 179-190.

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

Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2017). *Robbins basic pathology e-book*. Elsevier Health Sciences.

Léa Blandine, N. G. (2001). *Les établissements publics d'assistance et de répression pendant la Révolution Française: le cas des Pyrénées-Orientales comparé à celui de Paris* (Doctoral dissertation).

Leiva, S., Rubio, K., Díaz-Valderrama, J. R., Granda-Santos, M., & Mattos, L. (2022). Phylogenetic Affinity in the Potential Antagonism of Trichoderma spp. against Moniliophthora roreri. *Agronomy*, *12*(9), 2052.

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

Lisiewska, Z., Słupski, J., Kmiecik, W., & Gębczyński, P. (2004). Amino acid profiles and protein quality of fresh and frozen dill depending on usable part of raw material, pre-treatment before freezing, and storage temperature of frozen products. *Food Science and Technology*, *7*(1), 03.

Lo CT, Nelson EB, Hayes CK, Harman GE, (1998). Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. Phytopathology 88:129-136.

Lopes, A. R. D. O., Locatelli, G. O., Barbosa, R. D. M., Lobo Junior, M., Moura Mascarin, G., and Lamenha Luna Finkler, C. (2020). Preparation, characterisation and cell viability of encapsulated *Trichoderma asperellum* in alginate beads. *Journal of Microencapsulation*, *37*(3), 270-282.

Lopez, A. C., Alvarenga, A. E., Vereschuk, M. L., Barua, R. C., Zapata, P. D., Luna, M. F., and Villaba, L. L. (2020). Trichoderma strains isolated from Ilex paraguariensis ST. HIL: promising biocontrol agents with chitinolytic activity and plant growth promoter on Lycopersicum esculentum. Arab Journal of Basic and Applied Sciences, 27(1), 105-113

López-López, M. E., Del-Toro-Sánchez, C. L., Gutiérrez-Lomelí, M., Ochoa-Ascencio, S., Aguilar-López, J. A., Robles-García, M. A., ... & Guerrero-Medina, P. J. (2022). Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against avocado (Persea americana Mill) fruit pathogens. *Horticulturae*, *8*(8), 714.

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

Lucey, J. A., Munro, P. A., & Singh, H. (1999). Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*, *9*(3-6), 275-279.

Malvick, D. Soybean seed and seedling diseases Minneapolis: University of Minnesota, 2017. Available at: https://extension.umn.edu/pest-management/soybean-seed-and-seedling-diseases Accessed on: 20 Sep. 2019.

Mansour, M., Aly, A. A., Habeb, M. M., and Mohamed, H. I. (2020). Control of cotton seedling damping-off by treating seed with inorganic salts. *Gesunde Pflanzen*, *72*(3), 273-283.

Matloob, A. A. A. H., Kareem, F. H., and Al-Baldawy, M. S. M. (2021). Efficiency of biological control agents and plant extracts against Rhizoctonia solani kuhn causing of damping off in cotton. *Indian Journal of Ecology*, *48*, 203-207.

McIntyre M, Nielsen J, Arnau J, van der Brink H, Hansen K, Madrid S. (2004) Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics. Copenhagen, Denmark

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

Modrzewska, M., Bryła, M., Kanabus, J., & Pierzgalski, A. (2022). Trichoderma as a biostimulator and biocontrol agent against Fusarium in the production of cereal crops: Opportunities and possibilities. *Plant Pathology*, *71*(7), 1471-1485.

Mohamed HI, Akladious SA (2017) Changes in antioxidants potential, secondary metabolites and plant hormones induced by different fungicides treatment in cotton plants. Pest Biochem Physiol 142:117–122

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

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

Mukerji, K.G; Garg, K.L(1987). Trichoderma as biocontrol agent. Biocontrol of plant diseases V.1, P.71-82.

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mukherjee, M., and Schmoll, M. (2013). Trichoderma: biology and applications. CAB. International,Wallingford,https://doi.org/10.1079/9781780642475.000.

Mukhtar I., Hannan A., Atiq A., and Nawz A. (2012). Impact of *Trichoderma* species on seed germination in Soybeen. Pskistan Journal of Phytopathology. 24(2): 159-162.

Nawrocka, J., Szymczak, K., Maćkowiak, A., Skwarek-Fadecka, M., and Małolepsza, U. (2022). Determination of Reactive Oxygen or Nitrogen Species and Novel Volatile Organic Compounds in the Defense Responses of Tomato Plants against Botrytis cinerea Induced by *Trichoderma virens* TRS 106. *Cells*, *11*(19), 3051.

Nielsen, K. F., Hansen, M. Ø., Larsen, T. O., and Thrane, U. (1998). Production of trichothecene mycotoxins on water damaged gypsum boards in Danish buildings. International biodeterioration and biodegradation, 42(1), 1-7.

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

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

Padwick, G. W. (1945). THE FUTURE OF MYCOLOGICAL RESEARCH IN INDIA. *Current Science*, *14*(4), 85-88.

Pandey A, Fernandes M, Larroche C, 2008. *Current developments in solid-state fermentation*. Springer New York, US, 517p. DOI: 10.1007/978-0-387-75213-6;

Pandian, J. D., Singh, G., Kaur, P., Bansal, R., Paul, B. S., Singla, M., ... and Sharma, M. (2016). Incidence, short-term outcome, and spatial distribution of stroke patients in Ludhiana, India. *Neurology*, *86*(5), 425-433.

Paningbatan, R. A. (1994). Trichoderma sp. for the Biocontrol of Sweet Pepper Stem Rot (Sclerotium rolfsii Sacc). Phil. Phytopatho., l, 30, 16-25.

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

Pimentel, M., Saad, R. J., Long, M. D., & Rao, S. S. (2020). ACG clinical guideline: small intestinal bacterial overgrowth. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, *115*(2), 165-178.

Prasad, D., and Anes, K. M. (2008). Effect of metabolites of *Trichoderma harzianum* and T. viride on plant growth and meloidogyne incognita on okra. Annual Plant Proection Science. 16: 461-465.

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

Qiu, J., Lu, Y., He, D., Lee, Y. W., Ji, F., Xu, J., and Shi, J. (2020). *Fusarium fujikuroi* species complex associated with rice, maize and soybean from Jiangsu Province, China: phylogenetic, pathogenic and toxigenic analysis. Plant Disease, (ja).

Rai, S., Solanki, M. K., Solanki, A. C., and Surapathrudu, K. (2019). Biocontrol potential of *Trichoderma* spp.: current understandings and future outlooks on molecular techniques. In *Plant health under biotic stress* (pp. 129-160). Springer, Singapore.

Ramanujam B, Prasad R D, Rangeswaran R, 2010. Mass production, formulation, quality control and delivery of *Trichoderma* for plant disease management. *The Journal of Plant Protection Sciences* 2(2): 1-8.

Ramírez-Valdespino, C. A., Casas-Flores, S., and Olmedo-Monfil, V. (2019). Trichoderma as a model to study effector-like molecules. *Frontiers in microbiology*, *10*, 1030.

Rani, M., Shanker, U., & Jassal, V. (2017). Recent strategies for removal and degradation of persistent & toxic organochlorine pesticides using nanoparticles: a review. *Journal of environmental management*, *190*, 208-222.

Raut, S. A., Meshram, J. H., and Lal, E. P. (2019). Effect of mepiquat chloride on cotton var Suraj shoot and root growth behaviour. *IJCS*, *7*(3), 946-950.

Ray, R. R., Arutselvan, R., Sahu, N. K., Jena, S. K., & Priyadarshini, P. (2022). Potential Benefits of Trichoderma Based Products and It's Disease Management. *Biotica Research Today*, *4*(5), 355-358.

Refai, T., Ali, I. N., Abdel Nabi, H. M., Aly, A. A., Khalil, M. I., and Abd-Elsalam, K. (2022). Pathogenicity assay of some soil-borne fungi isolated from cotton seedlings. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, *100*(1), 41-48.

Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernandez-Galan, R., and Collado, I. G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. Phytochemistry Reviews, 7(1), 89-123.

Ren, X., Branà, M. T., Haidukowski, M., Gallo, A., Zhang, Q., Logrieco, A. F., ... and Altomare, C. (2022). Potential of trichoderma spp. for biocontrol of aflatoxin-producing *aspergillus flavus*. *Toxins*, *14*(2), 86.

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

Rifai,A.(1969). Arevision of the genus *Trichoderma*,Mycological paper.116: 1-56

Rotem, J.(1994). The genus Alternaria, biology, epidemiology and pathogenicity. APS Press, St Paul, Minnesota, pp:1-325

Ruangwong, O. U., Wonglom, P., Suwannarach, N., Kumla, J., Thaochan, N., Chomnunti, P., ... & Sunpapao, A. (2021). Volatile organic compound from Trichoderma asperelloides TSU1: Impact on plant pathogenic fungi. *Journal of Fungi*, *7*(3), 187.

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

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

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Frisvad, J. C. (2004). *Introduction to food-and airborne fungi* (No. Ed. 7). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

Saravanakumar, K., Yu, C., Dou, K., Wang, M., Li, Y., and Chen, J. (2016). Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum. *Biological control*, *94*, 37-46.

Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature ecology & evolution*, *3*(3), 430-439.

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

Schroers, H. J., Samuels, G. J., Zhang, N., Short, D. P., Juba, J., and Geiser, D. M. (2016). Epitypification of Fusisporium (Fusarium) solani and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, *108*(4), 806-819.

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.

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

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, 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.

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

Silletti, S., Di Stasio, E., Van Oosten, M. J., Ventorino, V., Pepe, O., Napolitano, M., ... and Maggio, A. (2021). Biostimulant Activity of

Azotobacter chroococcum and *Trichoderma harzianum* in Durum Wheat under Water and Nitrogen Deficiency. Agronomy, 11(2), 380 Cotreras

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

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

Singh, J., Dutta, T., Kim, K. H., Rawat, M., Samddar, P., and Kumar, P. (2018). 'Green'synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. *Journal of nanobiotechnology*, *16*(1), 1-24.

Singh, S., Darroch, J. E., and Ashford, L. S. (2014). Adding it up: the costs and benefits of investing in sexual and reproductive health 2014.

Singh, U., IfraZoomi, O. A., Pandey, D., Chaudhary, K. L., and Kaur, H.(2022). Studied on the impact of Bt-cotton cultivation of rhizospheric and non-rhizospheric bacterial and fungal population in contrast to non Bt-cotton in natural system. Volume 7, Issue 5, Page No. 135-142

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

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

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

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

Stuart E.A. ; Azur M. ; Frangakis C.E. ; Leaf P.J. 2009. Practical imputation with large datasets: a case study of the Children's Mental Health Initiative . American Journal of Epidemiology. 169. 1133–1139. DOI: 10.1093/aje/kwp026.

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

Susca, A., Moretti, A., and Logrieco, A. F. (2017). Mycotoxin biosynthetic pathways: a window on the evolutionary relationships among toxigenic fungi. In *Modern Tools and Techniques to Understand Microbes* (pp. 135-148). Springer, Cham.

Szulc, J., Ruman, T., & Gutarowska, B. (2017). Metabolome profiles of moulds on carton-gypsum board and malt extract agar medium

obtained using an AuNPET SALDI-ToF-MS method. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *125*, 13-23.

Takashima, S., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H., & Uozumi, T. (1999). Molecular cloning and expression of the novel fungal β-glucosidase genes from Humicola grisea and Trichoderma reesei. *The Journal of Biochemistry*, *125*(4), 728-736.

Tijerino, A., Cardoza, R. E., Moraga, J., Malmierca, M. G., Vicente, F., Aleu, J., and 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.

Tin, M. M., Cho, C. H., Chan, K., James, A. E., & Ko, J. K. (2007). Astragalus saponins induce growth inhibition and apoptosis in human colon cancer cells and tumor xenograft. *Carcinogenesis*, *28*(6), 1347-1355.

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

Tumura, K. G., Pizetta, M., Silva, L. L. D., & Furtado, E. L. (2013). Evaluation of rubber tree clones for resistance to powdery mildew. *Summa Phytopathologica*, *39*, 252-257.

Tyes, R. J. ; Wilets, A. J. (1973). Fungal growth on methanol. J. Gen. Microbiol. 77:1-11

Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., and Jaroszuk-Ściseł, J. (2022). Trichoderma: The current status of its application in agriculture for the

biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(4), 2329.

Venkatesh, N., and Keller, N. P. (2019). Mycotoxins in conversation with bacteria and fungi. *Frontiers in microbiology*, *10*, 403.

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

Vicente, I., Baroncelli, R., Hermosa, R., Monte, E., Vannacci, G., & Sarrocco, S. (2022). Role and genetic basis of specialised secondary metabolites in Trichoderma ecophysiology. *Fungal Biology Reviews*, *39*, 83-99.

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

Vinale,F.;Sivasithamparam,K.;Ghisalberti,E.L.;Marra,R.;Barbetti,M.J.;Li,H.;Woo,S.L.;Lorito,M.(2008). AnovelroleforTrichoderma secondary metabolites in the interactions with plants. Physiol. Mol. Plant Pathol. 72, 80–86.

Waqas, M., Khan, A. L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S. M., Kim, Y. H., and Lee, I. J. (2012). Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules*, *17*(9), 10754-10773.

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

Watts, R., Dahiya, J., Chaudhary, K., and Tauro, P. (1988). Isolation and characterization of a new antifungal metabolite of *Trichoderma reesei*. Plant and Soil, 107(1), 81-84.

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., and 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.

Wiemann, P., Sieber, C. M., Von Bargen, K. W., Studt, L., Niehaus, E. M., Espino, J. J., ... & Tudzynski, B. (2013). Deciphering the cryptic genome: genome-wide analyses of the rice pathogen *Fusarium fujikuroi* reveal complex regulation of secondary metabolism and novel metabolites. *PLoS pathogens*, *9*(6), e1003475.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, *18*(22), 6531-6535.

Wink, M., and Schimmer, O. (2018). Molecular modes of action of defensive secondary metabolites. *Annual Plant Reviews Volume 39:*

Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites, *39*, 21-161.

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

Woo, S. B., Hellstein, J. W., & Kalmar, J. R. (2006). Systematic review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Annals of internal medicine*, *144*(10), 753-761.

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

Woo, S.L.; Ruocco, M.; Vinale, F.; Nigro, M.; Marra, R.; Lombardi, N.; Lorito, M.(2014) .*Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. Open Mycol. J., 8, 71–126.

Worlu, C. W., Nwauzoma, A. B., Chuku, E. C., and Ajuru, M. G. (2022). Comparative Effects of *Trichoderma* species on Growth Parameters and Yield of *Zea mays* (L.). *IJBMS-International Journal of Biological and Medicine Science*, *5*(02), 01-09.

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

Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H., & Zheng, C. (2007). Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, *86*(12-13), 1781-1788.

Yang, Z. S., Li, G. H., Zhao, P. J., Zheng, X., Luo, S. L., Li, L., ... and 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

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

Zaid, R., Koren, R., Kligun, E., Gupta, R., Leibman-Markus, M., Mukherjee, P. K., ... and Horwitz, B. A. (2022). Gliotoxin, an Immunosuppressive Fungal Metabolite, Primes Plant Immunity: Evidence from *Trichoderma virens*-Tomato Interaction. *Mbio*, *13*(4), e00389-22.

Zaki, S. A., Ouf, S. A., Aly, A. A., and Abd-Elsalam, K. A. (2021). Fungi Involved in Damping-off of Cotton Seedlings and Their Differential Pathogenicity on Two Cotton Cultivars. *Egyptian Journal of Botany*, *61*(3), 911-921.

Zapparata, A., Baroncelli, R., Durling, M. B., Kubicek, C. P., Karlsson, M., Vannacci, G., and Sarrocco, S. (2021). Fungal cross-talk: an integrated approach to study distance communication. *Fungal Genetics and Biology*, *148*, 103518.

Zewain, Q. K., Hassan, K. A., and Ali, S. F. (2019). Comparative performance of several novel organic formulations against root knot

nematode *Meloidogyne* spp. on eggplant crop under greenhouse condition. Research on Crops, 20(4), 802-808

Zhang, D. D., Dai, X. F., Klosterman, S. J., Subbarao, K. V., and Chen, J. Y. (2022). The secretome of Verticillium dahliae in collusion with plant defence responses modulates *Verticillium* wilt symptoms. *Biological Reviews*,1.

Zhang, S., Xu, B., Zhang, J., and Gan, Y. (2018). Identification of the antifungal activity of Trichoderma longibrachiatum T6 and assessment of bioactive substances in controlling phytopathgens. Pesticide biochemistry and physiology, 147, 5966.

Zhang, Y., Zhou, J., Zhao, L., Feng, Z., Wei, F., Bai, H., ... and Zhu, H. (2022). A review of the pathogenicity mechanism of Verticillium dahliae in cotton. *Journal of Cotton Research*, *5*(1), 1-13..

Zhao, L., Wang, F., Zhang, Y., & Zhang, J. (2014). Involvement of Trichoderma asperellum strain T6 in regulating iron acquisition in plants. *Journal of Basic Microbiology*, *54*(S1), S115-S124.

Zhao, L., Zhang, F., Ding, X., Wu, G., Lam, Y. Y., Wang, X., ... & Zhang, C. (2018). Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science*, *359*(6380), 1151-1156.

Zheng, Z., & Shetty, K. (2000). Solid-state bioconversion of phenolics from cranberry pomace and role of Lentinus edodes β-glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(3), 895-900.

Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., & Melton, D. A. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β-cells. *nature*, *455*(7213), 627-632.

ملحق (1): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Alternaria alternata isolate Y.N. 146 Aymen* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Alternaria alternata isolate Y.N. 146 Aymen internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: ON738701.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       ON738701                500 bp    DNA     linear   PLN 16-JUN-2022
DEFINITION  Alternaria alternata isolate Y.N. 146 Aymen internal transcribed
            spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal
            transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   ON738701
VERSION     ON738701.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Alternaria alternata
  ORGANISM  Alternaria alternata
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Dothideomycetes; Pleosporomycetidae; Pleosporales; Pleosporineae;
            Pleosporaceae; Alternaria; Alternaria sect. Alternaria; Alternaria
            alternata complex.
REFERENCE   1  (bases 1 to 500)
  AUTHORS   Mahdi,A.J., Husain,Y.N. and Lahuf,A.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (11-JUN-2022) Plant protection Department, Agriculture
            College-University of Kerbala, City center, Kerbala, Kerbala 56001,
            Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..500
                     /organism="Alternaria alternata"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N. 146 Aymen"
                     /db_xref="taxon:5599"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="2021"
     misc_RNA        <1..>500
                     /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and large
                     subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 ttacacaaat atgaaggcgg gctggaatct ctcggggtta cagccttgct gaattattca
```

```
 61 cccttgtctt ttgcgtactt cttgtttcct tggtgggttc gcccaccact aggacaaaca
121 taaacctttt gtaattgcaa tcagcgtcag taacaaatta ataattacaa ctttcaacaa
181 cggatctctt ggttctggca tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag tagtgtgaat
241 tgcagaattc agtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgccctttg gtattccaaa
301 gggcatgcct gttcgagcgt catttgtacc ctcaagcttt gcttggtgtt gggcgtcttg
361 tctctagctt tgctggagac tcgccttaaa gtaattggca gccggcctac tggtttcgga
421 gcgcagcaca agtcgcactc tctatcagca aaggtctagc atccattaag ccttttttca
481 acttttgacc tcggatcagg
```

ملحق (2): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Fusarium brachygibbosum isolate Y.N. 147 Aymen*
في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Fusarium brachygibbosum isolate Y.N. 147 Aymen internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GenBank: ON738702.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       ON738702                480 bp    DNA     linear   PLN 16-JUN-2022
DEFINITION  Fusarium brachygibbosum isolate Y.N. 147 Aymen internal transcribed
            spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete
            sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.
ACCESSION   ON738702
VERSION     ON738702.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Fusarium brachygibbosum
  ORGANISM  Fusarium brachygibbosum
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Nectriaceae;
            Fusarium.
REFERENCE   1  (bases 1 to 480)
  AUTHORS   Mahdi,A.J., Husain,Y.N. and Lahuf,A.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (11-JUN-2022) Plant protection Department, Agriculture
            College-University of Kerbala, City center, Kerbala, Kerbala 56001,
            Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..480
                     /organism="Fusarium brachygibbosum"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.N. 147 Aymen"
                     /db_xref="taxon:679434"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="2021"
     misc RNA        <1..>480
                     /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2"
ORIGIN
        1 ttaccgagtt tacaactccc aaacccctgt gaacatacct ttatgttgcc tcggcggatc
       61 agcccgcgcc ccgtaaaacg ggacggcccg ccgcaggaac cacaaaactc tgattttagt
      121 gtaacttctg agtctaaaaa acaaataaat caaaactttc aacaacggat ctcttggttc
      181 tggcatcgat gaagaacgca gcaaaatgcg ataagtaatg tgaattgcag aattcagtga
      241 atcatcgaat ctttgaacgc acattgcgcc cgccagtatt ctggcgggca tgcctgttcg
      301 agcgtcattt caaccctcaa gcccccgggt ttggtgttgg ggatcgggct gtactccagc
      361 ccggccccga aatctagtgg cggtctcgct gcagcctcca ttgcgtagta gctaacacct
      421 cgcaactgga acgcggcgcg gccaagccgt taaaccccca acttctgaat gttgacctcg
```

ملحق (3): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Fusarium solani isolate Y.N. 148 Aymen* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Fusarium solani isolate Y.N. 148 Aymen internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GenBank: ON738704.1

FASTA Graphics

Go to:

LOCUS ON738704 492 bp DNA linear PLN 16-JUN-2022
DEFINITION *Fusarium solani* isolate Y.N. 148 Aymen internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.
ACCESSION ON738704
VERSION ON738704.1
KEYWORDS .
SOURCE *Fusarium solani*
ORGANISM *Fusarium solani*
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Nectriaceae; Fusarium; Fusarium solani species complex.
REFERENCE 1 (bases 1 to 492)
AUTHORS Mahdi,A.J., Husain,Y.N. and Lahuf,A.A.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (11-JUN-2022) Plant protection Department, Agriculture College-University of Kerbala, City center, Kerbala, Kerbala 56001, Iraq
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..492
	/organism="Fusarium solani"
	/mol_type="genomic DNA"
	/isolate="Y.N. 148 Aymen"
	/db_xref="taxon:169388"
	/country="Iraq"
	/collection_date="2021"
misc_RNA	<1..>492
	/note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2"

ORIGIN

```
        1 accgagttat acaactcatc aaccctgtga acatacctaa aacgttgcct cggcgggaac
       61 agacggcccc gtaacacggg ccgcccccgc cagaggaccc cctaactctg tttctataat
      121 gtttcttctg agtaaacaag caaataaatt aaaactttca acaacggatc tcttggctct
      181 ggcatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga attcagtgaa
      241 tcatcgaatc tttgaacgca cattgcgccc gccagtattc tggcgggcat gcctgttcga
      301 gcgtcattac aaccctcagg cccccgggcc tggcgttggg gatcggcgga agccccctgc
      361 gggcacaacg ccgtccccca aatacagtgg cggtcccgcc gcagcttcca ttgcgtagta
      421 gctaacacct cgcaactgga gagcggcgcg gccacgccgt aaaacaccca acttctgaat
      481 gttgacctcg aa
```

Abstract

This study was conducted in the laboratories and fields of the College of Agriculture, Karbala University, during the agricultural season 2021-2022. With the aim of manufacturing a biocidal from different isolates of the fungus *Trichoderma* spp. supplemented with microsclerotia and the mycotoxins produced from them, to combat pathogens, including the pathogens of seeds decay and damping-off disease of cotton. Ten isolates of the fungus *Trichoderma* spp, diagnosed in previous studies, were tested, four of which were selected for biocidal manufacturing after testing their antagonistic ability and production of mycotoxins, and testing the possibility of overlap between them.

The biocide, which was called (FOUR.T) was synthesized by a compatibility synthesis of four isolates of the biological fungi *T.viride, T.pseudokoningii, T.reesei,* and *T.koningiopsis* after proving their ability to produce stone bodies (Micro sclerotia) on the medium. The liquid, and its production of mycotoxins (Trichodermin and Gliotoxin), and the fortification of the biocidal with them, to increase the effectiveness of the antagonistic pesticide against pathogens, and its biological efficiency under the conditions of storage and drought.

While a number of fungi associated with infected cotton seeds and seedlings were isolated in four different areas that were cultivated in Karbala governorate, the two fungi, *Fusarium* spp, and *Rhizoctonia* spp achieved the highest incidence of 75% for each of them, followed by the appearance of *Pythium* spp. and *Alternaria* sp. and *Verticillum* sp. The results of the pathogenicity test showed the virulence of *Fusarium brachygibbosum, Fusarium solani* and *Alternaria alternata* in attacking cotton seeds and seedlings and reducing the percentage of germination and

seedling growth. It achieved a significant significant effect in reducing the germination rate, which amounted to 0.0% and an inhibition rate of 100%.

Fungal isolates isolated from moldy cottonseeds and infected seedlings were phenotypically diagnosed based on microscopic characteristics, and the most virulent isolates were molecularly identified by analyzing the DNA base sequences of the ITS region after they were sent to the South Korean Macrogen Company for the purpose of determining the nucleotide sequence. The deposit number of these isolates was in the gene bank (ON738702), (ON738704), (ON738701) for isolates *F. brachygibbosum, F. solani,* and *A.alternata* respectively, and comparing each isolate with globally identified isolates in the gene bank.

The treatment of cotton seeds with isolates of the fungus *Trichoderma* spp. It has proven highly efficient in reducing infection rates and increasing cotton seedling germination rates. It also showed high efficiency against the pathogens *F.brachygibbosum*, *F.solani*, and *A.alternata*, where the percentage of inhibition ranged (40.62-94.44%), and the highest antagonistic ability reached 94.44% for the isolate *T.pseudokoningii* against the pathogenic fungus *F.solani.* The results of extracting toxins from the filters of *Trichoderma* spp. isolates used in the study revealed the presence of the mycotoxins Trichodermin and Gliotoxin in large quantities, and these toxins had a great role in inhibiting the growth of pathogenic fungi in the laboratory, where the percentage of inhibition ranged (69.44-86.11), with the highest percentage of inhibition reaching 86.11% T.viride isolate against the pathogenic fungus *A.alternata.*

While the results of field experiments showed the role of isolates of the fungus *Trichoderma* spp. The biocide (FOUR.T) in controlling pathogens showed a significant increase in the percentage of germination of cotton seeds and a decrease in the percentage of seed rot and seedling death

compared to the comparison treatment of pathogenic fungi. The highest percentage of germination was 100%, the percentage of inhibition was 0.00%, and the percentage of infection was 3.33%. When using the biocide (FOUR.T) prepared from isolates (*T. viride, T.pseudokoningii, T.koningiopsis and T. reesei)* against pathogens.

The isolates of the fungus *Trichoderma* spp. And the biocide (FOUR.T) significantly in plant growth parameters, where the results showed an increase in the fresh and dry weight of the vegetative and root masses of cotton seedlings, as the fresh weight ranged between (3-6 g), compared to the treatment of isolates *F. brachygibbosum, F. solani, A. alternata* which was 0.5, 1 and 1gm, respectively.

The results of induction of systemic resistance showed that isolates of *Trichoderma* spp, including the biocidal combination (FOUR.T) had a significant effect in inducing systemic resistance in plants in increasing the activity of peroxidase enzyme, polyphenol oxidase and phenols and an increase in the value of total chlorophyll, which urged plants to develop systemic resistance. Against the pathogens *F.brachygibbosum* F.solani and *A.alternate*, the value of chlorophyll ranged (0.72-0.86) units/gm fresh weight, and the activity of peroxide enzyme ranged 0.390-0.528 (units/gm fresh weight), and the value of phenols ranged 0.32-0.46. (mg/gm fresh weight), the highest activity of peroxide enzyme was 0.528 in the treatment of the biological preparation, as well as for chlorophyll and phenols, and it was 0.86, 0.46, respectively, while the activity of polyphenol oxidase enzyme ranged (1.29-1.65), and the highest effectiveness was in the treatment of isolate the fungus *T. .viride*, which reached 1.65 (units/gm fresh weight) against the pathogen *F.brachygibbosum*, and the treatment with isolate of the fungus *T. reesei* against the pathogen *F.solani*.

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

Integration of the Antibiotics Gliotoxin and Trichodermin and their produced isolates of *Trichoderma* spp in the manufacture of a biological preparation against the pathogens of seed rot and the damping-off disease of cotton seedlings

A Thesis submitted to the Council of the Faculty of Agriculture / Karbala University in Partial Fulfilment of the Requirements for the Master Degree in Plant Protiction

Provided by
Aymen Jasim Mahdi Al selkhi

Supervised by
Prof.Dr. Yasir Naser Alhamiri

1444 A.H **2022 A.D**