



جامعة الزاوية
إدارة الدراسات العليا والتدريب
كلية العلوم - قسم الأحياء
شعبة علم النبات

**تأثير الأوساط المغذية على فاعلية نواتج الايض الثانوي لفطر
التريكوديرما على فطر الفيوزاريوم والفرتيسيليوم**

The effect of Culture media on the activity of secondary metabolites of *Trichoderma*
on *Fusarium* and *Verticillium*

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في علوم النبات
بكلية العلوم جامعة الزاوية (ربيع 2023-2024)

مقدم من الطالبة:

سهير المختار برقدو

أشرف

د. علي أبو القاسم العاقل

للعام 2024م

الإقرار

أقر أنا سهير المختار الكوني برقديو بأن ما اشتملت عليه الرسالة إنما هو نتاج جهدي، باستثناء ما تمت الإشارة إليه حيثما ورد، وأن هذه الرسالة ككل أو أي جزء منها لم يقدم من قبل لنيل أي درجة علمية أو بحث علمي لدى أي مؤسسة تعليمية أو بحثية أخرى، وللجامعة حق توظيف الرسالة أو الأطروحة والاستفادة منها مصدرا مرجعيا للمعلومات، لأغراض الاطلاع أو الإعارة أو النشر بما لا يتعارض وحقوق الملكية الفكرية المقررة بالتشريعات النافذة.

التوقيع

التاريخ/...../20م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا

تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ

بِسْمِ اللَّهِ
الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سورة المجادلة، الآية (11)

الإهداء

إلى من ابصرت بها حياتي ... واستمدت منها قوتي واعتزازي بذاتي ... إلى
الشامخة التي علمتني معنى الاصرار وان لاشي مستحيل في الحياة
مع قوة الايمان والتخطيط السليم... إلى ينبوع العطاء المتفاني مدى

عمري

والدتي الغالية اطال الله في عمرها وجزاها خير الجزاء
إلى الكتف الواقي والكنز الباقي من جعل العلم منبع اشتياقي لك

أقدم وسام الاستحقاق

والدي العزيز، أطال الله في عمره

إلى الذين هم انطلاقة الماضي وعون الحاضر وسند المستقبل

أخوي . محمد ... على

إلى العلم ... ورواده ... وطلابه

إليكم جميعاً اهدى ثمرة جهدي

الباحثة

شكر وتقدير

أقدم بجزيل الشكر إلى الله عز وجل الذي بنعمته تتم الصالحات والذي أعانني بالصبر والثبات على المشقات طيلة هذه السنوات وعلى إتمام عملي هذا فالحمد لله حتى ترضى والحمد لله إن رضيت والحمد لله بعد الرضى

أقدم بجزيل الشكر والامتنان إلى الدكتور الفاضل / علي ابو القاسم العاقل بأشرافه على إعداد هذه الرسالة وجهوده المستمرة وتوجيهاته القيمة عبر مدة البحث فله مني فائق التقدير والاحترام

الباحثة

المستخلص

أثبتت فطر *Trichoderma* نجاحاً كبيراً كعامل مكافحة حيوية ضد معظم مسببات الأمراض النباتية من خلال عدة ميكانيكيات أهمها إنتاجه للمستقلبات الثانوية النشطة حيويًا.

تم عزل فطر *Trichoderma* من المنطقة المحيطة بجذور نبات الزيتون على الوسط المغذي الانتقائي *Trichoderma Selective Media (TSM)* على أساس الخصائص المزرعية للمستعمرات، تم اختيار 11 عزلة واختبرت لتقييم فاعليتها في اختبار التضاد الحيوي المزدوج، اظهرت 8 عزلات قدرتها على تثبيط فطر *Fusarium oxysporum* و *Verticillium dahliae* المسببان لمرض ذبول أشجار الزيتون، هذه العزلات تم اختيارها في الاختبارات الموالية (طريقة الأطباق المقلوبة واختبار غشاء السلوفان باستخدام الأوساط المغذية المختلفة)، من خلال هذه الاختبارات تم اختيار العزلة (*T3*) *Trichoderma reesei* كأفضل عزلة لقدرتها علي تثبيط الفطريات الممرضة في جميع الاختبارات وعلى جميع الأوساط التي استخدمت في هذه الدراسة.

تم استخلاص وتعريف هذه المستقلبات باستخدام كروماتوغرافيا الغاز- مطياف الكتلة Gas chromatography mass spectrometry، حيث بينت النتائج أن المستقلبات الناتجة من مستخلص *Trichoderma* على وسط مرق دكستروز البطاطس احتوت على 21 مركباً وكان المركب الرئيسي Phenylethyl Alcohol أما المستقلبات الناتجة من وسط التمر فكانت 28 مركباً والمركب الرئيسي هو Hexanedioic acid, bis (2-ethyl hexyl) ester وكانت المستقلبات الناتجة من وسط نواة التمر 18 مركباً والمركب الرئيسي Ethyl propanoate.

أكدت نتائج هذه الدراسة أن اختلاف مكونات الأوساط المغذية أدى إلى اختلاف المستقلبات المضادة لكل وسط وأظهرت الدراسات السابقة أن العديد منها كان لها فاعلية كبيرة مضادة للفطريات والبكتيريا المسببة لأمراض النبات وأن البعض منها كان ضمن الاستخدامات الصيدلانية.

Abstract

Trichoderma has achieved great success as a biological control agent against most plant pathogens, through several mechanisms, and one of the most important is the production of secondary bioactive metabolites.

Trichoderma was isolated from the area around the roots of the olive plant using *Trichoderma* selective medium (TSM), and Based on the culture characteristics of the colonies on the 11 isolates were selected and evaluated for their effectiveness in dual culture bioassay, 8 isolates showed their ability to inhibit *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae*, The Causative agents of wilting disease of olive tree, these isolates were selected in the subsequent tests (inverted plates method and Cellophane membraaane assay, using different culture media), through these assay, *Trichoderma reesei* (T3) was the bast isolate for its ability to inhibit the growth of pathogenic fungi in all tests and on all media that were used in this study.

These metabolites were detected and identified using gas chromatography-mass spectrometry. The results showed that the metabolites resulting from *Trichoderma* extract on the potato dextrose broth medium contained 21 compounds and the main compound was Phenylethyl Alcohol. However, the metabolites extracted by using the date medium were 28 compounds and the main compound is Hexanedioic acid, BIS (2-ethyl hexyl) Ester and the metabolites from the date kernel were 18 compounds and the main compound ethyl propanoate.

The results of this study confirmed that the difference in the components of nutrient media led to a difference in the anti-metabolites produced in each medium. Previous studies showed that many of them had great effectiveness against fungi and bacteria causing plant diseases, and some of them were used as ingredients in pharmaceutical drags.

فهرس المحتويات

I	الإقرار
II	الآية القرآنية
III	الإهداء
IV	شكر وتقدير
V	المستخلص
VI	Abstract
VII	فهرس المحتويات
XIII	فهرس الجداول
XVI	فهرس الأشكال
1	الفصل الأول: المقدمة
2	1. المقدمة:
3	2.1 الأهداف الرئيسية للدراسة
4	الفصل الثاني: الدراسات السابقة
5	2. الدراسات السابقة:
5	1.2 الكائن المرض <i>Fusarium</i>
6	1.1.2 الخصائص المظهرية والمجهريه لفطر <i>Fusarium</i>
8	2.2 الكائن المرض <i>Verticillium</i>
9	1.2.2 الخصائص المظهرية والمجهريه لفطر <i>Verticillium</i>

10	3.2	المكافحة الحيوية
10	4.2	<i>Trichoderma</i> كعامل مكافحة حيوية
11	1.4.2	أهمية <i>Trichoderma</i> كعامل مكافحة حيوية
13	2.4.2	عزل فطر <i>Trichoderma</i>
13	3.4.2	الخصائص المزرعية والمجهرية لفطر <i>Trichoderma</i>
15	5.2	آليات المكافحة الاحيائية لفطر <i>Trichoderma</i>
16	6.2	العوامل المؤثرة في التضاد الحيوي وإنتاج المستقلبات الأيضية معملياً
18	7.2	العزل والتوصيف الجزئي للمستقلبات المضادة للفطريات
20	8.2	مدى نشاط المضادات الحيوية المضادة للفطريات التي تنتجها <i>Trichoderma</i>
22	9.2	الطرق المتبعة في استخلاص، تحليل وتعريف نواتج الأيض الثانوية (المضادات الفطرية) ...
26		الفصل الثالث: المواد وطرائق البحث
27	3.	المواد وطرائق البحث
27	1.3	الأحياء الدقيقة في الدراسة:
27	2.3	عزل فطر (<i>Trichoderma spp.</i>)
28	3.3	عزل الفطريات الممرضة <i>Fusarium</i> و <i>Verticillium</i>
28	4.3	تعريف عزلات فطر <i>Trichoderma</i>
29	5.3	تعريف الفطر الممرض <i>F. oxysporum</i>

29	6.3 تعريف الفطر الممرض <i>V. dahliae</i>
29	7.3 اختبار القدرة الإراضية لفطر <i>V. dahliae</i> و <i>F. oxysporum</i>
30	8.3 اختبار التضاد الحيوي المزدوج على الأوساط المغذية
30	9.3 اختبار التضاد الحيوي للمركبات المتطايرة بطريقة الأطباق المقلوبة على الأوساط المغذية....
31	10.3 اختبار التضاد الحيوي للمركبات غير المتطايرة بطريقة غشاء السلوفان على الأوساط المغذية
32	11.3 تحضير طافي المزرعة الفطرية.....
32	12.3 التنقية الجزئية للمستقلبات الايضية المضادة للفطريات باستخدام الاستخلاص بالمذيبات ..
33	13.3 تقييم النشاط المضاد للفطريات.....
34	14.3 الفصل الكروماتوغرافي الغازي Gas Chromatograph Derivatisation
34	15.3 أدوات وشروط كروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة.....
35	16.3 تحديد المركبات المضادة للفطريات بواسطة GC / MS
36	17.3 التجارب والتحليل الإحصائي
37	الفصل الرابع: النتائج والمناقشة
38	4. النتائج والمناقشة.....
38	1.4 عزل وتعريف فطر <i>Trichoderma</i>
39	2.4 عزل وتعريف الفطريات الممرضة <i>V. dahliae</i> و <i>F. oxysporum</i>
41	3.4 اختبار القدرة الإراضية لفطر <i>V. dahliae</i> و <i>F. oxysporum</i>

4.4 اختبار التضاد الحيوي المزدوج على الأوساط المغذية لعزلات فطر <i>Trichoderma</i> ضد فطر <i>F. oxysporum</i>	41
1.4.4 تأثير الأوساط المغذية على عزلات فطر <i>Trichoderma</i> في اختبار التضاد الحيوي المزدوج على تثبيط نمو فطر <i>F. oxysporum</i>	41
2.4.4 تأثير عزلات فطر <i>Trichoderma</i> في تثبيط نمو فطر <i>F. oxysporum</i>	42
5.4 اختبار التضاد الحيوي للمركبات المتطايرة بطريقة الأطباق المقلوبة على الأوساط المغذية لعزلات فطر <i>Trichoderma</i> ضد فطر <i>F. oxysporum</i>	44
1.5.4 تأثير الأوساط المغذية على فاعلية عزلات فطر <i>Trichoderma</i> في إنتاج المركبات المتطايرة لتثبيط نمو فطر <i>F. oxysporum</i>	44
2.5.4 تأثير عزلات فطر <i>Trichoderma</i> في تثبيط نمو فطر <i>F. oxysporum</i>	45
6.4 اختبار التضاد الحيوي للمركبات غير المتطايرة بطريقة غشاء السلوفان على الأوساط المغذية لعزلات فطر <i>Trichoderma</i> ضد فطر <i>F. oxysporum</i>	48
1.6.4 تأثير الأوساط المغذية على فاعلية عزلات فطر <i>Trichoderma</i> في إنتاج المركبات غير المتطايرة لتثبيط نمو فطر <i>F. oxysporum</i>	48
2.6.4 تأثير عزلات فطر <i>Trichoderma</i> في تثبيط نمو فطر <i>F. oxysporum</i>	49
7.4 اختبار التضاد الحيوي المزدوج على الأوساط المغذية لعزلات فطر <i>Trichoderma</i> ضد فطر <i>Verticillium dahliae</i>	50
1.7.4 تأثير الأوساط المغذية على عزلات فطر <i>Trichoderma</i> في اختبار التضاد الحيوي المزدوج على تثبيط نمو فطر <i>V. dahliae</i>	50

2.7.4	تأثير عزلات فطر <i>Trichoderma</i> في تثبيط نمو فطر <i>V. dahliae</i>	52
8.4	اختبار التضاد الحيوي للمركبات المتطاييرة بطريقة الأطباق المقلوبة على الأوساط المغذية لعزلات فطر <i>Trichoderma</i> ضد فطر <i>V. dahliae</i>	54
1.8.4	تأثير الأوساط المغذية على فاعلية عزلات فطر <i>Trichoderma</i> في إنتاج المركبات المتطاييرة لتثبيط نمو فطر <i>V. dahliae</i>	54
2.8.4	تأثير عزلات فطر <i>Trichoderma</i> في تثبيط نمو فطر <i>V. dahliae</i>	56
9.4	اختبار التضاد الحيوي للمركبات غير المتطاييرة بطريقة غشاء السلوفان على الأوساط المغذية لعزلات فطر <i>Trichoderma</i> ضد فطر <i>V. dahliae</i>	58
1.9.4	تأثير الأوساط المغذية على فاعلية عزلات فطر <i>Trichoderma</i> في إنتاج المركبات غير المتطاييرة لتثبيط نمو فطر <i>V. dahliae</i>	58
2.9.4	تأثير عزلات فطر <i>Trichoderma</i> في تثبيط نمو فطر <i>V. dahliae</i>	59
10.4	تقييم النشاط المضاد للفطريات.....	60
11.4	تعريف المركبات المضادة للفطريات باستخدام جهاز التحليل الكروماتوغرافي الغازي - مطياف الكتلة GC/MS	61
1.11.4	مضادات الفطريات المتعرف عليها في وسط مرق دكستروز البطاطس لشق الحامضي ..	61
2.11.4	مضادات الفطريات المتعرف عليها في وسط مستخلص التمر لشق الحامضي.....	65
3.11.4	مضادات الفطريات المتعرف عليها في وسط مستخلص نواة التمر لشق الحامضي.....	70
74	الخلاصة	74

74	نتائج البحث.....
76	التوصيات.....
77	المراجع.....
78	المراجع.....
109	الملاحق.....

فهرس الجداول

الجدول (1.2) المستقلبات الأيضية المستخلصة والمنقاة مع نشاط مضاد للفطريات ضد <i>Fusarium</i>	24
جدول (2.2) قائمة ببعض النواتج الأيضية المستخدمة في عدة تطبيقات.....	25
جدول (1.4): تعريف عزلات فطر <i>Trichoderma</i> على مستوى النوع بواسطة الخصائص المظهرية والمجهريية.....	39
جدول (2.4): تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر <i>Trichoderma</i> في تثبيط نمو فطر <i>Fusarium oxysporum</i> (سم).....	42
جدول (3.4): متوسط تأثير عزلات فطر <i>Trichoderma</i> على تثبيط نمو فطر <i>oxysporum</i> <i>Fusarium</i> (سم).....	43
جدول (4.4): تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر <i>Trichoderma</i> في تثبيط نمو فطر <i>Fusarium oxysporum</i> (سم).....	45
جدول (5.4): متوسط تأثير عزلات فطر <i>Trichoderma</i> على تثبيط نمو فطر <i>Fusarium oxysporum</i> (سم).....	47
جدول (6.4): تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر <i>Trichoderma</i> في تثبيط نمو فطر <i>Fusarium oxysporum</i> (سم).....	48
جدول (7.4): متوسط تأثير عزلات فطر <i>Trichoderma</i> على تثبيط نمو فطر <i>Fusarium oxysporum</i> (سم).....	49

جدول (8.4): تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر

51 (سم) *Verticillium dahliae*

جدول (9.4): متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Verticillium*

53 (سم) *dahliae*

جدول (10.4): تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو

55 فطر *Verticillium dahliae* (سم).

جدول (11.4): متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *Verticillium*

57 (سم) *dahliae*

جدول (12.4): تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر

58 (سم) *Verticillium dahliae*

جدول (13.4): متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Verticillium*

59 (سم) *dahliae*

الجدول (14.4) تعريف المركبات المضادة للفطريات لوسط مرق دكستروز البطاطس باستخدام جهاز

63 التحليل الغازي الكروماتوغرافي وبمساعدة مكتبة الأطياف GC- MS

جدول (15.4) المركبات المتحصل عليها من الوسط المغذي لمرق دكستروز البطاطس التي أشارت

64 الدراسات إلى فعاليتها.

الجدول (16.4) تعريف المركبات المضادة للفطريات لوسط مرق التمر باستخدام جهاز التحليل الغازي

67 الكروماتوغرافي وبمساعدة مكتبة الأطياف GC- MS

جدول (17.4) المركبات المتحصل عليها من الوسط المغذي التمر التي أشارت الدراسات إلى فعاليتها

68

الجدول (18.4) تعريف المركبات المضادة للفطريات لوسط مرق نواة التمر باستخدام جهاز التحليل

الغازي الكروماتوغرافي وبمساعدة مكتبة الأطياف GC- MS 73

فهرس الأشكال

- شكل (1.2) الخصائص المزرعية المورفولوجية للفيوزاريوم (A). مستعمرة لفطر الفيوزاريوم على الوسط PDA. (B). منظر مجهري لماكروكونيديا لفطر *F. oxysporium* تظهر مقسمة إلى 3 اقسام، ومعلقة على الميسيليوم.....7
- شكل (2.2) الخصائص المزرعية والسمات المورفولوجية لفطر فرتيسيليوم. (A) مستعمرة نمت على الوسط المغذي (PDA) في 25 درجة مئوية لمدة 20 يوما. (B) ميسيليوم والحامل الكونيدي والكونيديا.....10
- شكل (3.2) خصائص النمو لعزلة لفطر *Trichoderma* على الوسط المغذي (PDA).....14
- شكل (4.2) الخصائص المجهرية لفطر *Trichoderma spp.* تحت المجهر.....15
- شكل (1.4) نمو *Trichoderma* على الوسط الانتقائي.....38
- شكل (2.4) عزلة نقية لفطر *Fusarium*.....40
- شكل (3.4) عزلة نقية لفطر *Verticillium*.....40
- شكل (4.4) تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *Fusarium oxysporum* (سم).....42
- شكل (5.4) اختبار التضاد الحيوي المزدوج لفطر *Trichoderma* على فطر *oxysporum* (A) تقابل الفطر الممرض والفطر المضاد على نفس طبق PDA في اليوم السادس من التحضين (B) وجود الفطر الممرض (الشاهد) في غياب الفطر المضاد على طبق PDA في اليوم السادس من التحضين.....43

- شكل (6.4) متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *oxysporum*
 44 *Fusarium* (سم)
- شكل (7.4) تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر
 45 *Fusarium oxysporum* (سم)
- شكل (8.4) اختبار التضاد الحيوي للمركبات المتطايرة بطريقة الاطباق المقلوبة لعزلات فطر
Trichoderma على تثبيط فطر *Fusarium oxysporum* (A) طبق معاملة الشاهد اليوم الثالث
 من التحضين. (B) طبق المعاملة الفطر المضاد في وجود الفطر الممرض في اليوم الثالث من
 التحضين 46
- شكل (9.4) متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Fusarium*
 47 *oxysporum* (سم)
- شكل (10.4) تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر
 48 *Fusarium Oxysporum* (سم)
- شكل (11.4) متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Fusarium*
 50 *Oxysporum* (سم)
- شكل (12.4) تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر
 51 *Verticillium dahliae* (سم)
- شكل (13.4) اختبار التضاد الحيوي المزدوج لعزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط فطر
Verticillium dahliae (A) وجود الفطر الممرض والفطر المضاد على نفس الطبق. (B) طبق
 (الشاهد) وجود الممرض وغياب فطر المضاد. 53

- شكل (14.4) متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Verticillium*
 54dahliae (سم)
- شكل (15.4) تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر
 55*Verticillium dahliae* (سم)
- شكل (16.4) اختبار التضاد الحيوي للمركبات المتطايرة بطريقة الأطباق المقلوبة لعزلات فطر
Trichoderma على فطر *Verticillium dahliae* . (A) طبق (الشاهد) وجود الفطر الممرض
 فقط. (B) طبق المعاملة الفطر التضاد مع الفطر الممرض. 56
- شكل (17.4) متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Verticillium*
 57dahliae (سم)
- شكل (18.4) تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر
 58*Verticillium dahliae* (سم)
- شكل (19.4) متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Verticillium*
 60dahliae (سم)
- شكل (20.4) تقييم النشاط المضاد لمستخلص التمر على فطر الفيوزاريوم بين الشقوق الثلاثة. (A)
 الحامضية (B) المتعادلة (C) القاعدية مقارنة بالمذيب كمشاهد. 61

قائمة الاختصارات

الإدارة المتكاملة لأمراض النبات	IPM •
اجار دكستروز البطاطس	PDA •
الكروماتوغرافي الغازي / الطيف الكتلي	GC/MS •
منطقة التقييد التي تشير إلى تعدد الأشكال	PCR-RFLP •
النمط الجيني للفصل بين الجينات	IGS •
تربة اجار	AS •
الفرتيسيليوم	V •
عامل المكافحة الحيوية	BCA •
التريكوديرما	T •
الفيوزاريوم	F •
الوسط الانتقائي للترايكوديرما	TSM •
النسبة المئوية	% •
ثنائي إيثيل الإيثر	C ₄ H ₁₀ O •
ثنائي كلورو ميثان	CH ₂ CL ₂ •
هيدروكسيد الصوديوم	NaOH •
ثنائي ميثيل سلفوكسيد	DMSO •
خليط من (ثلاثي ميثيل سيليل (trimethylsilyl) ثلاثي فلورو أسيتاميد	BSTFA •
trifluoroacetamide	
برنامج الحزم الإحصائية للعلوم الاجتماعية.	SPSS •
زمن الإحتجاز الفعلي	RI •

الفصل الاول:

المقدمة

1. المقدمة:

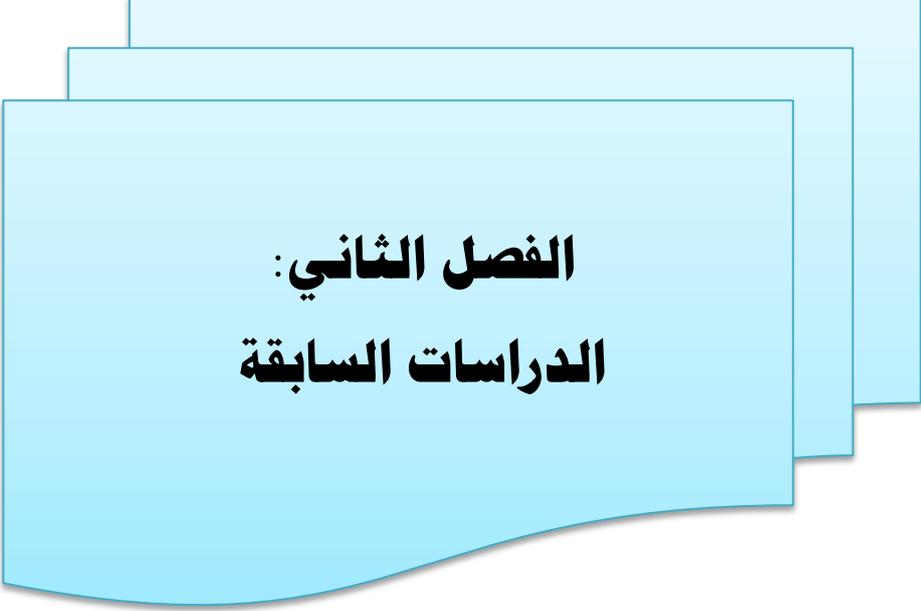
تصاب النباتات بالعديد من المسببات المرضية مسببة في خسائر اقتصادية كبيرة (Lipton و Ryall، 1972) فطر الفيوزاريوم *Fusarium* وفطر الفرتيسيليوم *Verticillium* من الفطريات الساكنة للتربة و المنقولة عن طريق البذور والتي تعتبر مهمة اقتصاديًا في العديد من مناطق الزراعة حول العالم لما تسببه من أمراض نباتية مختلفة (Dendouga وآخرون، 2016؛ Prange وآخرون، 2005) الهدف من أي طريقة لإدارة امراض النبات هو الحد من نسبة وشدة الإصابة في المحاصيل الزراعية (Parry، 1990) إلا أنه لوحظ في العقود الأخيرة ازدياد استخدام المبيدات، للحد من الخسائر الاقتصادية الناجمة عن هذه المسببات المرضية، خطورة الاستخدام المفرط لهذه المبيدات وما تسببه من أضرار بيئية كبيرة وتأثيرها على صحة الانسان والحيوان علاوة على دخول هذه المبيدات في السلسلة الغذائية (Hardwick وآخرون، 2001)، وظهور صفة المقاومة لهذه الكيماويات من قبل مسببات أمراض مما أدى للبحث عن بدائل استخدام المبيدات وهي الادارة المتكاملة لأمراض النبات (IPM) Integrated Pest Management كرد فعل نتيجة للمشاكل الناجمة عن الاستخدام المكثف غير الواعي لمبيدات الآفات كإحدى عوامل التلوث (ابوعرقوب، 2000).

أشارت العديد من الدراسات السابقة إلى نجاح إمكانية استخدام الأحياء الدقيقة كعامل مكافحة حيوية لمكافحة مسببات الأمراض النباتية منها البكتيريا والفطريات (Koumoutsi وآخرون، 2004؛ Atehnkeng وآخرون، 2008) ومن أهم أجناس الفطريات المستخدمة كعوامل مكافحة حيوية هو فطر *Trichoderma* في مكافحة العديد من الفطريات المسببة للأمراض النباتية (Yaquub وShahzad، 2008) أشارت العديد من الدراسات السابقة عن نجاح وإمكانية استخدام عدة عزلات

من فطر *Trichoderma* كعوامل حيوية مضادة لمسببات الأمراض، النباتية منها العديد من أنواع *Fusarium* و *Verticillium* (Dubey وآخرون، 2007). وقد طور الفطر كمنتجات حيوية (Bioproducts) بشكل تجاري تستخدم كمبيدات حيوية في الحقل أو تحت ظروف الزراعة المحمية منذ حوالي عقدين من الزمن (Harman، 2000). ونجاح استخدام *Trichoderma* في مكافحة الحيوية تعتمد على عدة آليات وأن هذه الآليات تتأثر بعدة عوامل فيزيائية وكيميائية والتي سنتطرق لها باستفاضة في جزء الدراسات السابقة.

2.1 الأهداف الرئيسية للدراسة

- عزل فطر *Trichoderma* من التربة المحيطة بجذور بعض المحاصيل من منطقة الرايزوسفير (Rhizosphere) باستخدام وسط الآجار الانتقائي (*Trichoderma Selective Media*).
- تقييم قدرة العزلات في اختبار التضاد الحيوي (Antibiosis) معمليا (*in vitro*) في تثبيط فطر *Fusarium* و *Verticillium* باستخدام الوسط المغذي اجار دكستروز البطاطس Potato Dextrose Agar (PDA) ومقارنته بالتثبيط على الأوساط المغذية المحضرة من التمر ونواة التمر.
 - استخلاص وتنقية المستقلبات المضادة الفطرية Antifungal Metabolites لفطر *Trichoderma* وتقييم فعاليتها على تثبط النمو الفطري لكل من *Fusarium* و *Verticillium* باستخدام أوساط مغذية سائلة محضرة من التمر ونواة التمر ومقارنتها بالوسط المغذي مرق دكستروز البطاطس.
 - تعريف وتوصيف المستقلبات المضادة للفطريات باستخدام جهاز كروماتوغرافيا الغاز / قياس الطيف الكتلي (GC-MS) Gas chromatography mass spectrometry



الفصل الثاني:
الدراسات السابقة

2. الدراسات السابقة:

حسب توقعات منظمة الأغذية والزراعة سيبلغ عدد سكان العالم 9.1 مليار نسمة في عام 2050 مما سيتطلب زيادة الإنتاج الغذائي الإجمالي بنحو 70% (منظمة الأغذية والزراعة 2009).

ساعدت الزيادة الكبيرة في إنتاج الحبوب الغذائية على مر السنين على تلبية احتياجات الأمن الغذائي ولكن المسببات الحيوية وغير الحيوية سببت خسائر في المحاصيل إلى حد كبير، تشمل المسببات الحيوية الفطريات والبكتيريا والفيروسات، الديدان الخيطية والأعشاب الضارة وحشرات الآفات التي تسبب خسائر في المحاصيل تقدر بنسبة 31% - 42% (Agrios، 2005).

تلعب أمراض النبات دورا مباشرا في تدمير المحاصيل الزراعية، وقدرت الخسارة في محاصيل الفاكهة (78%) والخضروات (54%) والحبوب (32%) على وجه التحديد، فإن الأمراض التي تسببها مسببات الأمراض التي تنقلها التربة مدمرة وتنتشر بسرعة، مما يتسبب في خسارة اقتصادية هائلة للمحاصيل المهمة (Velasquez وآخرون، 2018).

ومن أهم الفطريات المنقولة عن طريق التربة هو جنس *Fusarium* و *Verticillium* المسببان للعديد من الأمراض النباتية أهمها الذبول الوعائي على مستوى العالم.

1.2 الكائن الممرض *Fusarium*

Fusarium جنس من الفطريات الخيطية وأحد مسببات الأمراض النباتية الهامة علاوة على إنتاجه لبعض السموم الفطرية الضارة بصحة الإنسان والحيوان (Shim و Woloshuk، 2013) والذي اكتشف الفطر من قبل العالم Link سنة 1809 (Krska وآخرون، 2007).

يسبب فطر الفيوزاريوم العديد من الأمراض النباتية لعدة عوائل مسبب خسائر اقتصادية كبيرة للمحاصيل الزراعية كما بينت العديد من الدراسات (Ferrigo وآخرون، 2016؛ Pritsch وآخرون، 2000)، ويعتبر مرض الذبول الوعائي الذي يسبب مشاكل كبيرة للعوائل النباتية أهمها العائل الاقتصادي نبات الزيتون كما تبين في الدراسة التي قام بها (Trabelsi وآخرون، 2017) يصنف الفطر في صف Hyphomycetes الذي ينتمي إلى مجموعة الفطريات الناقصة Deuteromycotina، الطور الجنسي Teleomorphs يتمثل في جنس *Nectria* و *Gibberella* المنتميان لرتبة Hypocreales في مجموعة الفطريات الأسكية Ascomycota، الطور اللاجنسي (Anamorph) للفطر يتمثل في تكوين الأبواغ الصغيرة (Microconidia) والكبيرة (Macroconidia)، الطور الجنسي يتميز بتكوين أبواغ أسكية داخل جسم ثمري قاروري Perithecia ذات لون أزرق غامق أو بنفسجي إلى أسود (Nelson وآخرون، 1983a).

1.1.2 الخصائص المظهرية والمجهريّة لفطر *Fusarium*

يعتمد تحديد أنواع *Fusarium* بشكل أساسي على الخصائص المميزة لأشكال وأحجام الكونيدات الكبيرة والصغيرة، ووجود وغياب الأبواغ الكلاميديّة، وظهور المستعمرات، والتصبغات، ومعدلات النمو على وسط الأجار (Leslie و Summerell، 2006). ومن الشائع استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل مع تعدد أشكال طول الجزء المقيد Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) لمنطقة التباعد بين الجينات Intergenic Spacer (IGS) Genotyping حيث يبدو أن منطقة IGS هي منطقة مباحدة سريعة التطور (Hseu وآخرون، 1996). يمكن الاعتماد على هذه التقنية بدرجة كبيرة في تمييز السلالات على المستوى غير المحدد في دراسات تصنيف *Fusarium* (Hillis و Dixon، 1991؛ Gerlach و Nirenberg، 1982).

يمكن الاعتماد في تحديد الأنواع على الخصائص المورفولوجية للعزلات أحادية البوغ كما وصفها (Nelson وآخرون، 1983؛ Gerlach و Nirenber، 1982) لتحديد الخصائص المجهرية يمكن تنمية العزلات على أجار دكستروز البطاطس لمدة 2-4 أسابيع (Fisher وآخرون، 1982)، أو يمكن استخدام أجار التربة (Soil Agar (SA) لتعزيز تكوين الأبواغ الكونيدية (Klotz وآخرون، 1988). يتم التحضين تحت ظروف الحضانة التي وصفها Salleh و Sulaiman (1984) لمدة أسبوعين على الأقل وملاحظة المظاهر الخارجية (لون المستعمرة والتصبغات) لوحظ أن ألوان مستعمرات الفطر في السطح الاعلى تختلف حسب النوع وتتراوح ألوانها من الابيض إلى الوردى والبنفسجي وذات غزل فطري كثيف أما لون مستعمراتها من الجهة الخلفية للطبق فقد تتراوح بين الوردى أو البنفسجي أو بني، أما الخصائص المجهرية وجود التراكيب الفطرية المتمثلة بالأبواغ الكونيدية الكبيرة (Macroconidia) ذات الشكل الهلالي التي تعتبر أحد الصفات المميزة لوجود الفطر، إضافة إلى الابواغ الكونيدية الصغيرة (Microconidia) التي تظهر بيضوية إلى كروية كما في الدراسة التي قام بها (مرجان و الجنابي، 2015) الشكل (شكل 1.2).



شكل (1.2) الخصائص المزرعية المورفولوجية للفيوزاريوم (A). مستعمرة لفطر الفيوزاريوم على الوسط PDA. (B). منظر مجهرى لماكروكونيديا لفطر *F. oxysporium* تظهر مقسمة إلى 3 اقسام، ومعلقة على الميسيليوم.

2.2 الكائن الممرض *Verticillium*

منذ أن تم التعرف على جنس *Verticillium* من قبل Nees von Esenbeckin في عام 1817، تم تصنيف ما يقرب من 190 نوعاً تحت هذا الجنس (Inderbitzin وآخرون، 2011). هذا الفطر يتبع فصيلة Plectosphaerellaceae تحت مجموعة Ascomycota إلا أن بعض من الأنواع تنتمي إلى مجموعة الفطريات الناقصة Deutromycota التي لم يعرف لها طور جنسي (Agrios، 2005) حالياً يضم هذا الجنس عشرة أنواع مختلفة على أساس الخصائص الجزيئية المورفولوجية مثل الطور المقاوم والقدرة على التسبب في الذبول في النباتات (Inderbitzin وآخرون، 2011).

أمراض *Verticillium* من أكثر أمراض النباتات تدميراً تصيب العديد من الأنواع النباتية في جميع أنحاء العالم (López-Escudero و Mercado-Blanco، 2011)، ومن أهم هذه الأمراض وأخطرها مرض الذبول الوعائي (Fradin و Thomma، 2006) المتسبب عن *Verticillium dahliae* الذي ينتقل عن طريق التربة (Pegg و Brady، 2002؛ Ruggieri، 1946) ويؤثر على حوالي 400 نوع نباتي مثل القطن والطماطم واللوز والفسنق وغيرها من النباتات (Klosterman وآخرون، 2009؛ Keykhasaber وآخرون، 2018) وأهمها نبات الزيتون (Landa وآخرون، 2019؛ Castro وآخرون، 2020) وتم وصف المرض أول مرة في إيطاليا (Ruggieri، 1946) والذي يسبب خسائر اقتصادية تقدر بمليارات الدولارات سنوياً في جميع أنحاء العالم (Pegg و Brady، 2002).

يعد ذبول *Verticillium* مرضاً مهماً اقتصادياً يؤثر على مئات الأنواع النباتية ثنائية الفلقة في جميع أنحاء العالم، ليس فقط في المحاصيل الحقلية والخضروات والفواكه ولكن أيضاً في نباتات الزينة (Daayf، 2015؛ Song و Thomma، 2018؛ Johnson و Dung، 2010) هناك أنواع

مختلفة من فطر *Verticillium* سجلت على أن لها القدرة على أحداث إصابات مرضية مؤثرة في النباتات (Klosterman وآخرون، 2009؛ Barbara و Clewes، 2003) حيث تبين أنها في بعض الحالات تسبب أمراضاً عند الاقتران مع مسببات الأمراض الأخرى (Rowe وآخرون، 1985؛ Li وآخرون، 2017). تشمل المسببات المرضية الأخرى والتي يمكنها أن تزيد من خطر الإصابة بأمراض *Verticillium* الإصابات البكتيرية والطفيلية المختلفة.

1.2.2 الخصائص المظهرية والمجهريّة لفطر *Verticillium*

لوحظ العديد من الدراسات أن العوامل المصابة بهذا الفطر تتواجد عليها اجسام ذات هيكل سميك مغلط تعرف بالأجسام الحجرية الدقيقة *Microsclerotia* اللقاح الأساسي *V. dahliae* يسمح للفطر بالبقاء في التربة لمدة تصل إلى 14 عاما وبالتالي قدرتها على إصابة أعداد متزايدة من المحاصيل الاقتصادية المهمة في المواسم التالية، ويرجع السبب في ذلك إلى قدرة أنواع هذا الفطر على تحمل الظروف البيئية القاسية، والتي عادة ما تكون في صالح تطور هذا المرض (Lopez-Escudero وآخرون، 2011).

يكون الفطر هيفات ملونة تميل إلى اللون الغامق (شكل 2) وسلاسل قصيرة من الخلايا المستديرة تعرف بالأبواغ الكلاميدية وهي الطور المقاوم إلى جانب *Microsclerotia* (Pegg و Brady، 2002).

على الرغم من أن بعض الأنواع لا يمكن تمييزها شكليا إلا أنه يتم استخدام *Microsclerotia* للتفريق بين الأنواع *V. dahliae*، *V. longisporum* و *V. tricorpus*، وهناك أيضاً أنواع أخرى *V. isaacii*، *V. klebahnii* و *V. zaregamsianum*. يتم تمييز أنواع الفرتيسيليوم المكونة للميكروسكليروتيا شكليا بناء على الكونيديا القصيرة (*V. dahliae*) والكونيديا الطويلة (شكل 2) كما في النوع (*V. longisporum*) (Inderbitzin وآخرون، 2011).



شكل (2.2) الخصائص المزرعية والسماط المورفولوجية لفطر فرتيسيليوم. (A) مستعمرة نمت على الوسط المغذي (PDA) في 25 درجة مئوية لمدة 20 يوماً. (B) ميسيليوم والحامل الكونيدي والكونيديا

3.2 المكافحة الحيوية

نظراً لتزايد الاهتمام بمشاكل المبيدات وبقائها كما تمت الإشارة إليه تحولت أنظار العلماء في مجال أمراض النبات إلى إيجاد طرائق بديلة للمكافحة الكيميائية وذلك باستخدام ما يعرف بالمكافحة المتكاملة وأن من أحد الخيارات هي المكافحة الحيوية باستخدام كائنات حية الدقيقة النافعة لخفض تأثير أو للقضاء على الكائنات الحية الدقيقة الضارة (Parthasarathy و Sathiyabama، 2016) هي أفضل بديل ضد مسببات الأمراض ومن مميزاتا صديقة للبيئة واقتصادياً غير مكلفة (Gohel وآخرون، 2006) وتم التعرف على بعض الفطريات والبكتيريا التي تنقلها التربة واستخدامها ضد مسببات الأمراض التي تنتقل عن طريق التربة (Agrios, 2005)، ومن أهم الفطريات المستخدمة في المكافحة الحيوية فطر *Trichoderma*.

4.2 فطر *Trichoderma* كعامل مكافحة حيوية

فطر *Trichoderma* عبارة عن مجموعة أنواع تنتمي إلى عائلة Hypocreaceae، صف Sordariomycetes التابع لمجموعة الفطريات الأسكية Ascomycota عادةً يكون متواجد في

جميع أنواع التربة بشكل شائع، وهي من الفطريات الانتهازية بعضها يعيش بصورة متكافلة مع جذور بعض النباتات والكثير منها يكون متطفل على الفطريات الأخرى.

Trichoderma جنس من الفطريات الخيطية الموجودة في جميع أنواع التربة والمواد النباتية والنباتات المتحللة والخشب (Gajera وآخرون، 2013) الذي تم التعرف عليه منذ عشرينات القرن الماضي بقدرتها على العمل كعوامل للمكافحة الحيوية (BCA) ضد مسببات الأمراض النباتية (Samuels، 1996) وممن المعروف أنه يتحكم في أمراض النبات بيولوجياً أكثر من 70 عاماً (Weindling، 1932) ومن الأنواع الأكثر شيوعاً من جنس *Trichoderma* هي سلالات *Trichoderma viride* و *Trichoderma vitans*، *Trichoderma harzianum* (Perello وآخرون، 2003؛ Metcalf و Wilson، 2001) وهي واحدة من الفطريات التي تمت دراستها على نطاق واسع نظراً لتطبيقاتها العديدة منها الزراعية والصناعية والدوائية والبيئية (Mukherjee وآخرون، 2013؛ Schuster و Schmoll، 2010) وتم وصفها لأول مرة سنة 1794 (Persoon، 1794).

1.4.2 أهمية *Trichoderma* كعامل مكافحة حيوية

تستخدم أنواع من جنس *Trichoderma* ليست فقط للسيطرة على أمراض النبات كما ذكرنا سابقاً ولكن أيضاً لها القدرة على تعزيز نمو النبات وتطوره والقدرة على النمو في ظل الظروف المعاكسة (Pandya وآخرون، 2011؛ Tripathi وآخرون، 2013) وتم استخدامها كعوامل تحكم بيولوجي ضد مسببات الأمراض الفطرية (Harman وآخرون، 2004؛ Kubicek وآخرون، 2001) أما بشكل غير مباشر من خلال التنافس على العناصر الغذائية في الفضاء وتعزيز نمو النبات والتضاد الحيوي وآليات الدفاعية للنبات وبشكل مباشر عن طريق آليات مثل التطفل الفطري (Harman وآخرون، 2004) ونشير لدراسة التي قام بها (Kushwaha و Verma، 2014) أن فطر *Trichoderma hamantum* و *Trichoderma viride*، *Trichoderma harzianum*

لديها القدرة على تثبيط نمو الفطريات المسببة للأمراض *Alternaria*, *Chollatrichum* يعمل *Trichoderma viride* فطر *Paracercospora* و *Fusarium*، وبينت دراسة أخرى أن فطر *Pyricularia oryzae* تثبيط فطر *Heminthosporium oryzae* بنسبة 74.4% فطر *Rhizoctonia solani* بنسبة 71.1% (Arumugam وآخرون، 2013) كما أشارت الدراسات إلي اهميه فطر *Trichoderma* في مكافحة فطر *Fusarium* و *Verticillium* على العديد من العوائل النباتية كما في الدراسة التي قام بها (Zhi-xiang وآخرون، 2020) فإن فطر *Trichoderma* قادر على تثبيط فطر *Fusarium* بنسبة تزيد عن 70% وفي الدراسة التي قام بها (Shah، 2020) ذكر أن فطر *T. viride* تعمل على تثبيط فطر *F. solani* بنسبة 82.91% و *F. oxysporum* بنسبة 82.38% أما الدراسة التي قام بها (Fotoohiyan وآخرون، 2017) أن *T. harzianum* كانت لها القدرة على تثبيط فطر *V. dahliae* بنسبة 88.89%.

يستخدم فطر *Trichoderma* ليست فقط كعامل لمكافحة الفطريات الممرضة بل تستخدم أيضاً لمكافحة البكتيريا الممرضة (Verma وآخرون، 2007) كما أوضحت الدراسة التي قام بها (Saleh وآخرون، 2011) أن *Trichoderma viride* و *Trichoderma reesei* كانت فعالة للغاية ضد البكتيريا المسببة للأمراض، كما لها أيضا فعالية ضد النيما تودا (Mukhtar، 2021) ومن الخصائص التي تجعلها ذات أهمية كبيرة إنتاج المستقلبات الثانوية ذات الطبيعة المتطايرة أو غير المتطايرة وذات أهمية كبيرة للبشرية في التطبيقات الطبية والصناعية والزراعية (Schnurer وآخرون، 1999؛ Korpi وآخرون، 2009).

عام 2001، سجل مركز وقاية النبات في بريطانيا ستة أنواع من *Trichoderma* للاستخدام التجاري في بريطانيا ضد العديد من مسببات الأمراض النباتية التي تنتقل عن طريق التربة وقد سجلت رسميا كمبيدات حيوية (Copping، 2001).

2.4.2 عزل فطر *Trichoderma*

تم ملاحظة نمو فطر *Trichoderma* على وسائط استزراع مختلفة لدراسات مختلفة باستخدام وسائط داعمة متوفرة وأرخص نسبياً مثل أجار وجبة الذرة، وأجار الشوفان، وأجار دكستروز البطاطس وأجار تشابيك دو كس، ووسائط المغذيات الخاصة، وأجار الجزر، وأجار البنغال الوردي، والوسائط الانتقائية. ومع ذلك، فإن الوسائط الانتقائية تفضل نمو سلالات *Trichoderma* على الفطريات الأخرى، وبالتالي فهي مفضلة لسهولة التعرف على عزلات *Trichoderma* على الفطريات سريعة النمو التي قد تتداخل معها.

يتم التعرف على وسط فطر *Trichoderma* الانتقائية *Trichoderma selective* (TSM) media للعزل من التربة، يتكون من الجلوكوز بمستويات منخفضة للحد من النمو وتكوين الأبواغ للفطريات سريعة النمو. يستخدم الكلورامفينيكول لتثبيط نمو البكتيريا، في حين يتم استخدام خماسي كلور نيتروبنزين، وصبغة البنغال الوردية كمثبطات فطرية انتقائية.

يتم عزل فطر *Trichoderma* من التربة باستخدام التخفيفات المتسلسلة على الوسط المغذي الانتقائي (TSM) لعزل، عادة ما يكون نمو *Trichoderma* سريعاً، في درجات حرارة تتراوح بين 25-30 درجة مئوية ولكنها لن تنمو عند 35 درجة مئوية وعند درجة حموضة pH6 تظهر المستعمرات شفافة عندما تنمو على وسط مثل أجار الذرة، لكنها تكون بيضاء عندما تنمو على وسائط أكثر ثراءً مثل أجار دكستروز البطاطس، بعض الأنواع تنبعث منها رائحة وصفت بأنها لطيفة أو "شبيهة بجوز الهند" (Aneja، 2003).

3.4.2 الخصائص المزرعية والمجهرية لفطر *Trichoderma*

على الوسط المغذي (PDA) يكون فطر *Trichoderma* بصورة عامة على شكل حلقات متحدة المركز مع إنتاج كونيدي أخضر، يكون إنتاج الكونيديا أكثر كثافة في الوسط ثم باتجاه الحواف وتكون النموات حبيبية قليلاً على الوسط المغذي، مع كونيديا الخضراء موزعة في جميع أنحاء

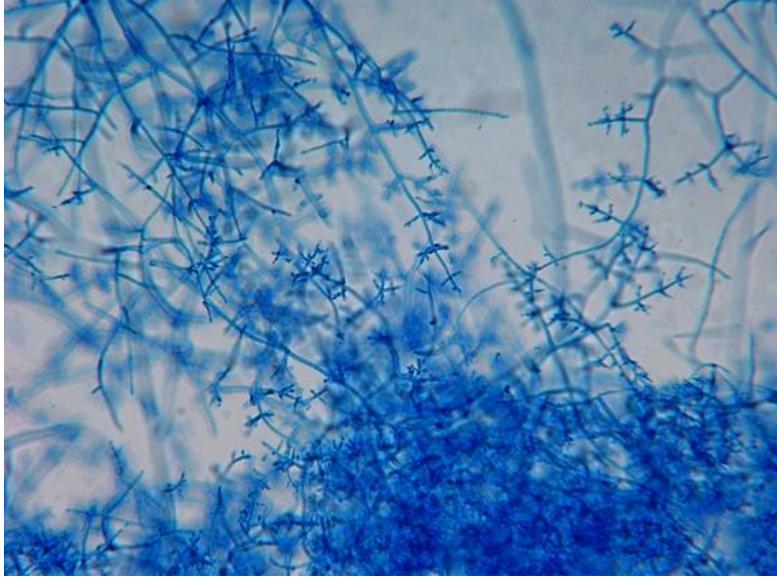
المزرعة، كما تظهر بعض العزلات منطقة صفراء غير منتظمة بدون كونيديا حول قرص اللقاح، كما تظهر بعض العزلات على بعض البثور البيضاء تنمو على نمو الكونيديا الخضراء (شكل 3.2) (Elad وآخرون، 1981).

غالباً ما ينمو فطر *Trichoderma* في مستعمرات مكونه كونيديات تحتوي أكياس بوجية عديدة وسريعة الانتشار في أوساط النمو المدعومة غذائياً، تتفرع Conidiophores على نطاق واسع ونتيجة لذلك يصعب وصفها أو تحديدها.



شكل (3.2) خصائص النمو لعزلة لفطر *Trichoderma* على الوسط المغذي (PDA).

قد تكون معنقدة واسعة الشكل أو مضغوطة وغالباً ما تتطور في حلقات متحدة المركز منفصلة أو يتم حملها على طول الواصلة الهوائية المتناثرة، تولد الفروع الرئيسية للحوامل الكونيدية فروعاً جانبية قد يتم إقرانها أو لا يتم، مع وجود الفروع الأطول بعيداً عن طرف الحامل الكونيدي وغالباً ما تنشأ الفالييدات مباشرة من المحور الرئيسي الموجود بالقرب من الحافة، قد تشكل الفروع مزيداً من الفروع الجانبية، حيث غالباً ما تشكل الفروع الثانوية أزواجاً وتكون الفروع الثانوية ذات الأطوال الأكبر أقرب إلى المحور الأساسي، نقطة الأصل لكل فرع رئيسي وثانوي إما أن تكون بالضبط أو قريبة جداً من 90 درجة فيما يتعلق بالمحور الرئيسي (شكل 4.2).



شكل (4.2) الخصائص المجهرية لفطر *Trichoderma spp.* تحت المجهر

5.2 آليات مكافحة الاحيائية لفطر *Trichoderma*

أظهرت عدة دراسات عن آليات مكافحة الحيوية التي من الممكن أن يستخدمه فطر التريكوثيرما كما ذكره Al-Ameri وآخرون (2022) عدة آليات أهمها:

1. التطفل: تمتلك *Trichoderma* قابلية تضادية لبعض فطريات التربة وغيرها من الفطريات الممرضة للنبات بواسطة إفرازاتها الإنزيمية والسمية التي تسبب تحلل وموت الفطر.
2. التضاد: تؤدي المضادات الحيوية والمضادات الفطرية دوراً مهماً في مكافحة الأمراض النباتية بواسطة أنواع *Trichoderma* المختلفة وتعرف على أنها تفاعلات تتضمن إنتاج مركبات ذات وزن جزيئي منخفض.

3. النواتج الأيضية: تنتج مواد ايضية يمكنها أن تتدخل في نمو ونشاط الاحياء الممرضة مثل انزيمات التحلل Lytic Enzymes والتي تعتبر من بين أكثر المواد الايضية كفاءة في تكسير المركبات البوليميرية Polymeric Compounds والتي تشمل Cellulose، Protein، Hemicellulose

والحمض النووي DNA قد أظهرت العديد من الدراسات قدرة بعض المواد الأيضية في إيقاف العديد من الممرضات النباتية.

4. المنافسة: هي قدرة عامل مكافحة الحيوية على منافسة الممرضات النباتية على الغذاء والمكان، حيث تتميز *Trichoderma* بكفاءة عالية في النمو والتكاثر وتكوين أعداد هائلة من الأبواغ مقارنةً بغيره من الكائنات الأخرى المتنافس معها ويزداد التنافس عندما يكون المصدر الغذائي في التربة محدداً.

إذاً فالتنافس بين الأحياء يعتمد على وجود المغذيات وبعض العوامل الأخرى المحددة للنمو كالمكان والأكسجين (Cook و Baker، 1983) أشار Lo وآخرون، (1996) أن الكائن الحي المستخدم في مكافحة الحيوية لا يمكن اعتباره منافساً جيداً إلا إذا كان قادراً على النمو بصورة جيدة في المنطقة المحيطة بالجذر مشيراً إلى أهمية الخواص الفيزيائية والكيميائية للتربة وما لها من تأثير في نمو الكائن المجهرى فضلاً على كفاءته التنافسية.

6.2 العوامل المؤثرة في التضاد الحيوي وإنتاج المستقلبات الأيضية معملياً

عند اختبار قدرة الكائنات الدقيقة في التربة كعوامل مكافحة الحيوية، هناك العديد من العوامل التي قد تؤثر على نتائج الاختبارات، مثل الأوساط المغذية المستخدمة، والكائنات الحية الدقيقة نفسها (الممرض والمضاد)، ودرجة الحرارة ودرجة الحموضة (Es-Soufi وآخرون، 2017).

كمية اللقاح ووقت التطبيق أيضاً تؤثر بشكل واضح على نتائج الاختبارات الحيوية في المعمل (Knudsent وآخرون، 1997). وقد ثبت أن هذه العوامل تؤثر على إنتاج المستقلبات المضادة للفطريات (Borowicz و Omer، 2000).

أختبر Dickie و Bell (1995) تأثير تسعة عوامل على نتائج اختبار التضاد الحيوي معمليا للعزلات البكتيرية، كانت سلالة البكتيريا، صنف النبات، وسط، درجة حرارة، الرقم الهيدروجيني والوسط المغذي المستخدم لاختبار التضاد الحيوي، وخلصوا إلى أن جميع العوامل التسعة كان لها تأثير كبير على قطر مناطق التثبيط.

هناك العديد من الدراسات التي تشير إلى أن الاختبارات المعملية باستخدام أوساط مغذية ضرورية لتحديد ما إذا كانت العزلات مبدئياً لديها القدرة على تثبيط مسببات الأمراض (Berg وآخرون، 2001).

Yassin وآخرون، (2022) ذكر أن فطر *Trichoderma* أظهرت تضاداً قوياً معمليا ضد مسببات الأمراض النباتية الفطرية المختلفة في اختبار التضاد الحيوي عن طريق إنتاج مستقلبات مضادة للفطريات خارج الخلية.

Naher وآخرون، (2012) درس تثبيط نمو مسببات الأمراض النباتية، بواسطة *Trichoderma* على أنواع مختلفة من الأوساط المغذية وخلص إلى أن مصدر الكربون ومصدر النيتروجين له تأثير على إنتاج المضادات الحيوية وزيادة تثبيط العامل الممرض، كما أدت إضافة بعض المعادن إلى وسائط الاستزراع إلى زيادة إنتاج المضادات الحيوية.

تم توضيح ذلك بشكل جيد من قبل (Milner وآخرون، 1996) أن إنتاج المضاد الحيوي kanosamine بواسطة جنس البكتيريا *Bacillus cereus* تم تعزيزه بأكثر من 300% عن طريق إضافة إفرازات شتلات البرسيم إلى وسط الاستزراع.

اختبر (Duffy و Defago، 1999) تأثير مجموعة متنوعة من مصادر الكربون والفوسفات والمعادن غير العضوية على إنتاج المضادات الحيوية بواسطة عدة سلالات من البكتيريا المعزولة من مجموعة واسعة من المناطق الجغرافية وتمثل مجموعات وراثية مختلفة، ووجدوا أنه في جميع السلالات

تقريباً، حفز الجلوكوز إنتاج المركب 2,4-Diacetylphloroglucinol، في حين أن تحفيز إنتاج هذا المركب بواسطة الزنك حدث بكميات محدودة جداً.

في الحقل تقدير إنتاج المضادات الفطرية وتنوعها في منطقة الرايزوسفير قد يكون معقداً، في المعمل، يحدث الإنتاج الأمثل للمركبات المضادة للفطريات في وجود بكثافة عالية للخلايا وظروف نمو مقيدة، في بيئة الجذور الطبيعية، قد تؤثر العديد من العوامل الحيوية وغير الحيوية على إنتاج المضادات الفطرية وأهمها المصادر المعدنية ومصادر الكربون (Haas وKeel، 2003) يمكن عزل *Trichoderma* التي لديها القدرة على تكوين مستقلبات مضادة للفطريات بسهولة من عينات التربة ومع ذلك، هناك عدد قليل من الدراسات كوفرتها كنسبة مئوية من إجمالي الأحياء الدقيقة الأخرى أظهرت العديد من الدراسات أن جميع *Trichoderma* المعزولة من التربة كانت قادرة على إنتاج مضادات للفطريات تثبط بعض مسببات الأمراض النباتية، يعتمد إنتاج هذه المستقلبات وغيرها في المعمل على ظروف الاستزراع، ومن المرجح أن يكون أكثر حساسية للبيئة الفيزيائية والكيميائية في منطقة الجذور (Hateet وآخرون، 2021).

7.2 العزل والتوصيف الجزئي للمستقلبات المضادة للفطريات

بعض الكائنات الحية الدقيقة كعوامل مكافحة حيوية أو أنشطتها الأيضية لها أهمية كبيرة لأنها تنتج مستقلبات مضادة للفطريات.

تشمل المضادات المعرفة على نطاق واسع مجموعة غير متجانسة كيميائياً من الجزيئات العضوية (Weller وThomashow، 1995).

وقد وصف إنتاج المضادات الحيوية كوسيلة قوية للعمل في مكافحة العديد من مسببات الأمراض أو الحد من نشاطها (Köhl وآخرون، 2019).

يمكن أن تساهم المضادات الفطرية في القدرة التنافسية ومكافحة مسببات أمراض الجذور النباتية، مثل لفحة وسقوط البادرات وأمراض الذبول الوعائي، وبالتالي فإن الفطريات التي تنتجها لها أهمية كبيرة كوسيلة عملية لمكافحة أمراض النبات. يعتمد الدليل على أن هذه المركبات يتم إنتاجها في الحقل على استخلاصها الكيميائي من منطقة الجذور في السلالات المنتجة التي تستعمر جذور النباتات، تصف الدراسات التأثيرات العدائية للعديد من الكائنات الحية الدقيقة، والتي يشار إليها غالبا باسم عوامل المكافحة الحيوية المحتملة، ضد مجموعة متنوعة من الفطريات الممرضة للنبات.

من بين الكائنات الحية الدقيقة التي تنتج المستقلبات ذات النشاط المضاد للفطريات، ثبت أن الفطريات من جنس *Trichoderma* تنتج مستقلبات ثانوية نشطة ضد الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض النباتية، اقترح بعض الباحثين أن استخدام مثل هذه السلالات أو الأنواع، أو مستقلباتها، قد يكون بديلا لوقاية النباتات بدلا من استخدام المبيدات الكيميائية (Kohl وآخرون، 2019؛ Khan وآخرون، 2020).

تنتج سلالات فطر *Trichoderma* عدة أنواع من المضادات الحيوية الفطرية، ومن المعروف أيضا أن التريكوديرما تنتج معززات نمو النبات من خلال توفير الحديد عن طريق وظيفة جلب الحديد مثل مركبات أخرى مثل السيدروفور *Siderophores* وهي مركبات تنتج خارج الخلية منخفضة الوزن الجزيئي، والتي لها صلة عالية بأيونات الحديد وقد تلعب دورا في المكافحة الحيوية، تم تأكيد بعض سلالات فطر *Trichoderma* على أنها تثبط أنشطة مسببات الأمراض النباتية بإنتاج باسيدوباكيتين basidobactin (Ghosh وآخرون، 2017؛ Mannai وM'Hamdi، 2022).

كان المضاد الحيوي أكثر آليات المكافحة الحيوية التي تمت دراستها على نطاق واسع، يعد تحديد النشاط في المختبر طريقة سريعة وسهلة لاختبار تأثير المضادات الحيوية في تثبيط العامل الممرض (Bardin وآخرون، 2020).

يتم توفير خط أكثر مباشرة من الأدلة على دور المضادات الحيوية في قمع المرض عن طريق عوامل مكافحة الحيوية عن طريق الكشف عن إنتاج المضادات الحيوية في الحقل، بسبب التعقيد الحيوي وغير الحيوي للتربة والبيئات المرتبطة بالنباتات، هناك العديد من الصعوبات المتأصلة في اكتشاف المضادات الحيوية التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة في الحقل، قد يتم إعاقة الاسترداد والكشف عن طريق عدم الاستقرار الكيميائي للمركب، أو الارتباط الذي لا رجعة فيه بغرويات التربة أو المواد العضوية، أو التحلل الميكروبي (Thomashow وآخرون، 1997).

8.2 مدى نشاط المضادات الحيوية المضادة للفطريات التي تنتجها *Trichoderma*

Benítez وآخرون، (2004) ذكر أن آليات تثبيط الفطريات يمكن توضيحها عن طريق إنتاج المستقلب الثانوي والمركبات المحلل لجدار الخلية الفطرية، بالإضافة إلى ذلك، تم العثور على إنتاج هرمونات النمو مثل إندول 3. حمض الخليك، كما ذكرت العديد من الدراسات ان في العديد من أنظمة مكافحة الحيوية التي تمت دراستها، ثبت أنتاج واحدا أو أكثر من المضادات الحيوية الفطرية التي تلعب دورا هاما في مكافحة مسببات الأمراض (Köhl، 2019).

تم العثور على عدد من العوامل المثبطة للأمراض عالية الفعالية بين أنواع *Trichoderma*، مما يجعلها المجموعة الأكثر دراسة على نطاق واسع من الاحياء الدقيقة الأخرى المنتجة للمضادات الحيوية في منطقة الجذور (Benitez وآخرون، 2004).

وتستمد معظم البيانات على افتراض المضادات الحيوية المنتجة في المعمل هي المركبات المسؤولة عن مكافحة الحيوية في النباتات حقليا، من المعروف أن العديد من سلالات *Trichoderma* تثبط نمو الفطريات في المعمل عن طريق إنتاج واحد أو أكثر من المضادات

الحيوية المضادة للفطريات، كما تبين أن بعض هذه المضادات الحيوية تثبط مسببات الأمراض في الحقل (Kohl وآخرون، 2019).

تم تحديد عدد قليل من المضادات الحيوية التي تنتجها عوامل مكافحة الحيوية، ولكن من المعلومات المحدودة المتاحة يبدو أن المضادات الحيوية هي نفسها أو مشابهة لتلك التي تم التحقيق منها المستخدمة كعقاقير طبية.

تشمل المضادات الحيوية مجموعة غير متجانسة كيميائياً من المركبات العضوية منخفضة الوزن الجزيئي التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة، وفيما يتعلق الفطريات المسببة للأمراض النباتية، وقد أظهرت بيرولنيتين pyrrolnitrin النشاط ضد مجموعة واسعة من الفطريات البازيدية والفطريات الناقصة والفطريات الأسكية، بما في ذلك العديد من مسببات الأمراض الهامة اقتصادياً مثل *Sclerotinia* و *V. dahliae*، *Botrytis cinerea*، *R. solani* و *sclerotiorum* (Howell، 2003؛ Khan وآخرون، 2020).

قد تكون المنتجات الميكروبية معقدة للغاية في تركيبها الكيميائي لدرجة أن مركبا واحداً قد يحتوي على شقين كيميائيين مختلفين تماماً أو أكثر يمكن أن يتفاعلا مع مستقلبات مختلفة (Howell، 2003) التعقيد في هيكلها قد يجعل المنتجات الطبيعية متنوعة كيميائياً وبيولوجياً، تم عزل العديد من سلالات *Trichoderma* التي تنتج المضادات الحيوية في المعمل من أنواع مختلفة من التربة والعوائل النباتية. يشير هذا التوزيع الواسع الواضح إلى أن *Trichoderma* المنتجة للمضادات الحيوية هي مكونات شائعة في التربة والبيئات المرتبطة بالنباتات في جميع أنحاء العالم ستساهم المعرفة حول بيئة سلالات *Trichoderma* التي تحدث بشكل طبيعي بشكل كبير في تحسين فعالية عوامل مكافحة الحيوية الحالية وقد تساعد في تحديد سلالات جديدة تتكيف بشكل أفضل مع تربة معينة أو عوائل محددة للممرضات النباتية.

9.2 الطرق المتبعة في استخلاص، تحليل وتعريف نواتج الأيض الثانوية (المضادات الفطرية)

نكر في العديد من الدراسات، الإجراء المناسب لاستخلاص العديد من المضادات الحيوية والفطرية التي ينتجها *Trichoderma* المعزولة عن المنطقة المحيطة بجذور النباتات (Conrado وآخرون، 2022) كما تم مؤخراً عزل مجموعة من المضادات الحيوية الجديدة من سلالات *Trichoderma* المعروفة (Kivanc و Kucuk، 2004).

ولفصلها عن المواد الأخرى يتم عن طريق ضبط كمية العينة المطلوبة واختيار المذيبات المناسبة. يمكن لهذه الطريقة استعادة استخلاص مركب أو مركبات محددة، والذي له خصائص ذوبان مختلفة. بشكل عام، يتم فصل العينات باستخدام بعض المذيبات المختلفة مثل (ثنائي إيثيل إيثر أو ثنائي كلورو ميثان) يشار إلى عمليات الاستخلاص هذه، التي تهدف في المقام الأول إلى إزالة المواد الكيميائية غير المرغوب فيها، باسم الغسلات، يشيع استخدام عدة أنواع من الغسلات منها الأحماض المائية مثل حمض الهيدروكلوريك أو حمض الخليك لاستخراج المركبات الأساسية، والقواعد المائية مثل هيدروكسيد الصوديوم أو كربونات الصوديوم أو بيكربونات الصوديوم لاستخراج المركبات الحمضية (Awad وآخرون، 2018).

هناك قدر هائل من المعلومات حول اختيار الكائنات الحية الدقيقة المضادة من الطبيعة وتأثيراتها وتوصيف المستقلبات الايضية، أشارت العديد من الدراسات عن عزل وتحديد المستقلبات المضادة للفطريات والمركبات المتطايرة (Zhang وآخرون، 2022؛ Tyskiewicz وآخرون، 2022؛ Guzman-Guzman وآخرون، 2023).

المستقلبات في روائح مزرعة *Trichoderma* قد يكون لها القدرة على السيطرة على العديد من الأمراض النباتية التي يسببها الفيوزاريوم كما أشار Stracquadanio وآخرون، (2020) في دراستهم، كان راسح المزرعة الخالية من الخلايا لسلالة *Trichoderma* نشطا ضد إنبات الأبواغ الكونيدية الكبيرة (Macroconidia) وكذلك ثبط نمو الميسيليوم للعديد من أنواع الفيوزاريوم.

Sobowale وآخرون، (2022)، وصف المستقلبات الايضية الفعالة لأنواع من فطر *Trichoderma* ضد *F. oxysporum*، تم التخلص من نمو *Trichoderma* النامية في الوسط المغذي السائل، وفصل مستقلبات الايض منخفضة الوزن الجزيئي من وسط الاستزراع بعد إزالة الكتلة الحيوية *Trichoderma* عن طريق الطرد المركزي، واختبار الطافي بعد الترشيح بالمرشحات البكتيرية. تم اختبار الترشيح باستخدام مقايسة انتشار في الأجار لقدرته على تثبيط الفطر. أظهرت نتائج دراستهم أن المرشح الخالي من الخلايا يثبط بشكل فعال فطر *Fusarium oxysporum*.

يأتي فطر *Trichoderma* كأحد أنجح عوامل المكافحة الحيوية، Verma وآخرون، (2007) ذكر أن ما يصل إلى 60% من مبيدات الفطريات الحيوية المسجلة المستخدمة في الزراعة اليوم هي تركيبات قائمة على فطر *Trichoderma*، هناك العديد من المنتجات المتاحة في السوق للاستخدام في الحقل ضد العديد من مسببات الأمراض (Singh وآخرون، 2009)، تفرز *Trichoderma* العديد من مجموعات المستقلبات الثانوية التي تثبط الفطريات المرضية النباتية مثل (بيرونات Pyrones، كونيغينين Koninginins، فيريدين Viridins، مركبات نيتروجين غير متجانسة Nitrogen Heterocyclic، أزافيلونات Azaphilones، بوتنوليدات Butenolides وهيدروكسي لاكتونات Hydroxy-Lactones، مستقلبات أيزوسيانو Isocyano Metabolites، ديكيتوبيبيرازين Diketopiperazines وبيبتايبول Peptaibols (Vinale وآخرون، 2014)، بما في ذلك العديد من المركبات المضادة للفطريات خاصة *Fusarium oxysporum* التي قدمت كمثال لهذه المضادات المبينة في (الجدول 1.2) (González وآخرون، 2023). تظهر العديد من الدراسات أن هذه المركبات فعالة في التحكم في الذبول الفيوزاريوم للعديد من المحاصيل مثل كونيغينين (Cardoza وآخرون، 2005).

الجدول (1.2) المستقلبات الأيضية المستخلصة والمنقاة مع نشاط مضاد للفطريات ضد *Fusarium oxysporum*.

تجربة	عزلات التريكوثيرما	المستقلبات
في المعمل وعلى الخلية الحية	<i>T. asperellum</i> <i>CCTCC-RW14</i>	N-à-(tert-Butoxycarbonyl)-L-Valine*
		6-Dimethylamino-4-keto hexanoic acid*
		1,3-Dioxolane,2-(3-bromo-5,5,5-trichloro-2,2-dimethylpentyl)*
		1-Aminocyclopentanecarboxylic acid, N- ethoxycarbonyl-, heptyl ester*
		2-[2-[2-Methoxyethoxy]ethoxy-1,3-dioxo- lane*
		1,6-diphenylhexane-1,3,4,6-tetrone*
		2-Octenoic acid*
		Methylmalonic acid*
		Milbemycin B*
		5-demethoxy-5-one-6,28-anhydro-25-ethyl-4-methyl-13-chloro-oxime*
	<i>T. aureoviride</i>	Koninginin G
في المعمل	<i>T. cremeum</i>	Cremenolide
	<i>T. Harzianum</i> <i>T. koningii</i>	6-pentyl-a-pyrone
في المعمل	<i>T. Harzianum</i>	Trichodermin
في المعمل وعلى الخلية الحية		Farzianopyridone
		8-dihydroxy-3-methylanthraquinone
		1,8-dihydroxy-3-methylanthraquinone
		1-hydroxy-3-methylanthraquinone
		6-methyl-1,3,8-trihydroxyanthraquinone
		1-hydroxy-3-methylanthraquinone
6-methyl-1,3,8-trihydroxyanthraquinone		
في المعمل	<i>T. koningii</i>	Stigmasterol
في المعمل		Koninginin E
		trichokonin VI
		trichokonin VII
		trichokonin VIII
في المعمل	<i>T. koningiopsis</i>	Koninginin A
		Koninginin B
في المعمل	<i>T. koningiopsis</i> <i>T.harziamum</i> <i>T. koningii</i> <i>T. aureoviride</i>	Koninginin D
في المعمل	<i>T. koningii</i> , <i>T. Koningiopsis</i>	Koninginin F

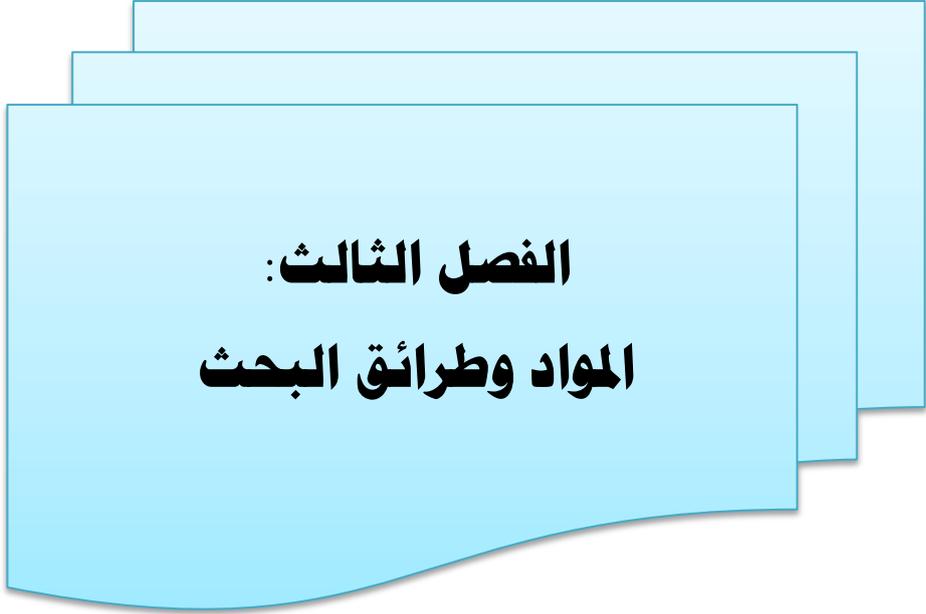
كما تنتج *Trichoderma* العديد من المستقلبات الأيضية ضد طيف واسع من مسببات

أمراض النبات بما فيها فطر الفريتسيليوم وغيرها من التطبيقات الأخرى مثل المبينة في الجدول (2.2)

(Keswani وآخرون، 2014).

جدول (2.2) قائمة ببعض النواتج الأيضية المستخدمة في عدة تطبيقات.

المركب المتحصل عليه	التطبيقات المختلفة
إيمودين Emodin	يستخدم في المسهلات المنبهة، علاج الأورام
جليوتوكسين Gilotoxin	مضادات الملاريا، المثبطات المناعية
هارزيانوليد Harzianolide	مضادات الفطريات، منظمات النمو النباتية
كونينجينينز Koninginins	مضادات الفطريات، منظمات النمو النباتية
ترايكوكينون Trichokonins	مضاد فطري واسع المدى
فيريدوفينجينز Viridiofungins	مضاد بكتيري، مركب ذو خواص محتملة مضادة للسرطان
فيريدين Viridin	مركب ذو مدى واسع من تطبيقات مضادات الفطريات
فيريديول Viridiol	مبيد للحشائش، مركبات مقاومة الشبخوخة



الفصل الثالث:
المواد وطرائق البحث

3. المواد وطرائق البحث

أجريت هذه الدراسة في مختبرات قسم وقاية النبات بكلية الزراعة، جامعة طرابلس، وتعاون مع مركز البحوث الزراعية بالقاهرة جمهورية مصر العربية في جزئية استخلاص وتعريف المستقلبات الأيضية المضادة للفطريات.

1.3 الأحياء الدقيقة في الدراسة:

عزل *Trichoderma* والكائنات الممرضان *Fusarium* و *Verticillium* محلياً، من جذور شتلات نبات الزيتون من بعض مناطق الساحل الغربي في ليبيا.

2.3 عزل فطر (*Trichoderma spp.*)

تم إزالة التربة الملتصقة بعناية من الجذور وجمع التربة المحيطة بجذور نبات الزيتون (تربة الغلاف الجذري) (10 جم / نبات) في أطباق بتري معقمة. تم تجفيف 100 جرام من تربة الغلاف الجذري في الهواء في المعمل لمدة 8 أيام عند درجة حرارة الغرفة لتقليل عدد الخلايا الميكروبية النباتية الحية وبالتالي المساعدة في عزل *Trichoderma* (Elad و Chet، 1983).

حُضرت معلقات التربة بإضافة 1جم من التربة إلى 9 مل من ماء مقطر معقم والهز لمدة 15 دقيقة. ثم تم تخفيف كل معلق بالتسلسل حتى 10^{-6} ، ثم يتم نشر 0.1 مل على الوسط الانتقائي *Trichoderma selective agar medium* (TSM)، تم تحضير الوسط المغذي كما مبين في (الملحق 1) كما في الطريقة التي قام بها (Leelavathi وآخرون، 2014).

كُشف على الاطباق بانتظام، وتم نقل لقاح من كل مستعمرة نامية واحدة ممثلة لكل نوع من الأنواع المختلفة إلى وسط أجار جديد للحصول على مزارع نقية، وتم بعدها تحضين العزلات ودراسة

الخصائص المجهرية للنمو الفطري ثم تخزين العزلات المنقاة على وسط آجار دكستروز البطاطس المائل عند 4 درجات مئوية (Bahatnagar، 1986)

3.3 عزل الفطريات الممرضة *Fusarium* و *Verticillium*

غُسلت الجذور وقاعدة الساق لشتلات نبات الزيتون المصابة التي ظهرت عليها أعراض الإصابة بالفطريات المذكورة تحت ماء الصنبور ثم تم تقسيمها إلى أجزاء صغيرة (1.5 سم)، وتعقيم السطح في هيبوكلوريت الصوديوم المائي (10% حجم / حجم) لمدة 5 دقائق ثم تم الغسل ثلاث مرات في ماء مقطر معقم، وضعت القطع بعد ذلك على آجار دكستروز البطاطس (PDA) الذي يحتوي على كبريتات الستربتوميسين (100 ميكروجرام مل⁻¹) والنيومايسين (50 ميكروجرام مل⁻¹) والكلورامفينيكول (50 ميكروجرام مل⁻¹)، اضيفت المضادات الحيوية إلى الآجار المنصهر بعد التعقيم عند تبريده إلى حوالي 50 درجة مئوية، تم تحضين جميع الأطباق الملقحة عند 28 درجة مئوية لمدة 6 أيام (Al-Jedabi، 2009)، تم التعرف على الفطريات المعزولة من خلال الخصائص المجهرية للنمو الفطري وشكل الأبواغ (Pettitt و Parry، 1993)، تم بعدها تنقية العزلات على آجار دكستروز البطاطس (PDA) ثم التحضين عند 28 درجة مئوية لمدة 6 أيام وتخزينها عند 4 درجات مئوية، حفظت العزلات في أنابيب الآجار المائل للمدى الطويل أكثر من ثلاثة أشهر (البوني، 1990)، تم حفظ اقراص الفطر mycelia (قطر 4 مم) في 20 مل من الماء المقطر المعقم في درجة حرارة الغرفة أكثر من سنة (De Capriles وآخرون، 1989)

4.3 تعريف عزلات فطر *Trichoderma*

لوحظت الخصائص المظهرية بما في ذلك (لون وشكل المستعمرات) والملاحظات المجهرية (شكل الكونيديا، والحامل الكونيدي، وعرض الذنبيات، وطول الذنبيات) وفقاً (Singh و Sharma، 2014)

5.3 تعريف الفطر الممرض *F. oxysporum*

لوحظت خصائص لون المستعمرات والخصائص المظهرية والمزرعية حسب ما ورد في دليل Nelson وآخرون، (1983b)، تم ملاحظة خيوط الفطر والحواجر العرضية، الحوامل الكونيدية Conidiophores، الذنبيات Phialides، وتركيب الخلية الطرفية وشكل الخلية القاعدية حجم وشكل الأبواغ الكونيدية الكبيرة Macroconidia، والأبواغ الكونيدية الصغيرة Microconidia.

6.3 تعريف الفطر الممرض *V. dahliae*

درست الخصائص المورفولوجية للعزلات الفطرية بتتقية العزلات على الوسط المغذي ديكستروز اجار البطاطس وتحسينها عند درجة 25 درجة مئوية لمدة اسبوعين، تم تحديد العزلات بناء على الخصائص المزرعية للمستعمرات والخصائص المورفولوجية للأبواغ الكونيدية وميكروسكليروتيا Microsclerotia كما وصفها Karapapa وآخرون، (1997)، بعد تنمية العزلات لمدة 14 يوم وتم فحص الخصائص المورفولوجية للميكروسكليروتيا باستخدام المجهر الضوئي.

7.3 اختبار القدرة الإراضية لفطر *V. dahliae* و *F. oxysporum*

حسب طريقة Correll وآخرون، (1988)، تم تنمية فطر *Fusarium oxysporum* و *Verticillium dahliae* كل على حده على الوسط المغذي أجار دكستروز البطاطس لمدة أسبوعين وتم الحصول على أبواغ الفطر بإضافة الماء المقطر والمعقم للطبق للحصول على معلق كونيدي، تم تلقيح جذور شتلات نبات الزيتون البالغة من العمر أربعة أسابيع بعد إحداث جروح بغمرها في المعلق لمدة خمس دقائق ثم غرسها في ابيض يحتوي على تربة معقمة، غمرت الشتلات في الماء المقطر والمعقم فقط كشاهد، تم ري الشتلات دوريا وبعد 4 أسابيع تم ملاحظة ظهور الأعراض.

8.3 اختبار التضاد الحيوي المزدوج على الأوساط المغذية

تم فحص جميع عزلات *Trichoderma* المختبر لقدرتها واختبارها على تثبيط أنواع *Fusarium* و *Verticillium* تم استخدام أوساط غذائية مختلفة منها التمر ونواة التمر والوسط الأساسي PDA تم تحضير الأوساط المغذية كما مبين في (الملحق 2، 3، 4) في اختبار التضاد الحيوي لفطر *Trichoderma*، أخذ قرص بقطر 5 مم من حواف مستعمرة فطريه للفطر *Fusarium* بعمر ستة أيام وزرع على حافة طبق بتري قطره 9 سم بشكل متناظر مع قرص من عزلات الفطر *Trichoderma* بعمر ثلاثة أيام على الوسط المغذي PDA، زرعت ثلاثة أطباق من كل معاملة، واعتبر الطبق الواحد مكررا، أما معاملة الشاهد فتمت زراعة قطعة اللقاح بالطريقة ذاتها ولكن بدون وجود الفطر *Trichoderma* في الطبق، حضنت المعاملات عند درجة حرارة 25 ± 1 لمدة 6 أيام، وتم تسجيل النتائج بقياس التثبيط في نمو قطر المستعمرة لفطر الممرض.

$$100 \times \frac{n1-n2}{n1}$$

n1 = متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر الممرض في معاملة الشاهد

n2 = متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر الممرض في معاملة *Trichoderma* (Nikam وآخرون،

2007؛ Khalid و Sahi، 2007)

9.3 اختبار التضاد الحيوي للمركبات المتطايرة بطريقة الأطباق المقلوبة على الأوساط المغذية

أجريت هذه التجربة باتتباع طريقة (Dennis و Webster، 1971a) تم حقن عزلات *Trichoderma* مركزيا بوضع قرص 5 مم من مزرعة عمرها ثلاثة أيام على الوسط المغذي PDA وحضنت عند 26 ± 2 لمدة ثلاثة أيام، ثم استبدال الغطاء العلوي من كل طبق بتري الملقح بعزلات *Trichoderma* بطبق من الوسط المغذي PDA الملقحة مركزيا مع العامل الممرض، ثم الحفاظ على طبق بتري مع وسط PDA بدون *Trichoderma* في الجزء السفلي والحفاظ على الجزء العلوي

مع مسببات الأمراض كشاهد تم غلق زوج من كل طبق بتري مع شريط البارافين وتحضينه لمدة 4-6 أيام، بعد الحضانة تم حساب تثبيط النمو الفطري للفيوزاريوم والفرتيسيليوم (Vincent، 1947).

$$100 \times \frac{n1-n2}{n1}$$

n1 = متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر الممرض في معاملة الشاهد

n2 = متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر الممرض في معاملة *Trichoderma*

10.3 اختبار التضاد الحيوي للمركبات غير المتطايرة بطريقة غشاء السلوفان على الأوساط المغذية

تم وضع قطعة من السلوفان المعقم بقطر 9 سم على وسط PDA وتم وضع قرص قطره 5 مم من عزلات *Trichoderma* المعزولة على PDA، حضنت المعاملات عند 26 درجة مئوية لمدة 4 أيام بعد فترة الحضانة، تمت إزالة السلوفان وتم وضع قرص قطره 5 مم من *Fusarium* و *Verticillium* من حواف مزرعة حديثة، حضنت المعاملات عند درجة حرارة 26 مئوية لمدة 6 أيام أخرى، تم حساب نسبة التثبيط (RI) Ratio Inhibition حسب المعادلة

$$RI = 100 \times (R_2 - R_1) / R_2$$

كما في الدراسة التي قام بها Watts وآخرون، (1988) حيث كان:

(RI) = متوسط قيمة ثلاث مكررات لكل عزلة

R₁ = متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر الممرض في معاملة *Trichoderma*

R₂ = متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر الممرض في معاملة الشاهد (Grondona وآخرون، 1997)

11.3 تحضير طافي المزرعة الفطرية

لدراسة فاعلية المضادات الفطرية في المكافحة الحيوية، تم تحضير اللقاح لكل عزلة بإضافة قرص بقطر 4 ملم من النمو لفطر التريكوثيرما في 5 مل من الوسط الغذائي السائل مستخلص الشعير لمدة 24 ساعة عند 28 درجة مئوية، تم نقل لقاح 2 مل لكل عزلة تريكوثيرما إلى 100 مل من الوسط المغذي المعدل (وسط مرق دكستروز البطاطس، وسط مرق التمر، ووسط مرق نواة التمر) تم تحضير الأوساط المغذية كما مبين في (الملحق 5، 6، 7) حضنت العزلات عند 28 درجة مئوية في هزاز متبادل عند 150 دورة في الدقيقة لمدة 6 أيام، تم الحصول على المادة الطافية عن طريق الطرد المركزي للمزرعة الفطرية عند 8000 دورة في الدقيقة لمدة 20 دقيقة، وتم ترشيح المواد الطافية من خلال المرشحات البكتيرية الغشائية المعقمة بقطر 0.2 ميكرون لضمان إزالة كل نمو التريكوثيرما. (Kivanc و Kucuk، 2004)

12.3 التنقية الجزئية للمستقلبات الايضية المضادة للفطريات باستخدام الاستخلاص بالمذيبات

خلط المواد الطافية (125 مل) لكل عزلة مع 200 مل من محلول بيكربونات الصوديوم المائي المشبع في ورق مخروطي جاف وتقسّم إلى ثلاثة اقسام. وإضافة كل قسم إلى قمع فصل وتم إذابته باستخدام 150 مل من ثنائي إيثيل الإيثر ($C_4H_{10}O$) أو ثنائي كلورو ميثان (CH_2CL_2). تم فصل المحلول إلى طبقتين (الطبقة العضوية والمائية) وتم التخلص من الطبقة المائية (Arunodhayam وآخرون، 2014)

تم إضافة حمض الهيدروكلوريك (2N) إلى جزء واحد من الطور العضوي المرشح والأس الهيدروجيني تم تعديله إلى الرقم الهيدروجيني 2، كما تم إضافة حمض الهيدروكلوريك (2N) إلى جزء ثانٍ حتى أصبح الرقم الهيدروجيني محايداً الرقم الهيدروجيني 7، بالنسبة للجزء الثالث، إضافة

هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) 2M حتى يصبح الرقم الهيدروجيني قلوياً الرقم الهيدروجيني 11 (Altinok، 2009).

تم إضافة 100 مل من ثنائي إيثيل الإيثر أو ثنائي كلورو ميثان مرة أخرى إلى كل جزء، وتم التخلص من الطور المائي وتم الاحتفاظ بالطور العضوي العلوي لكل عينة كمنتج حمضي، ومتعادل وقلوي، كل قسم تم تجفيفه باستخدام قليل من كبريتات المغنيسيوم اللامائية لإزالة أي بقايا مائية ثم تصفيتها باستخدام ورق ترشيح (Whatman، 180 مم، Whatman Ltd إنجلترا) للتخلص من كبريتات المغنيسيوم قبل التبخير حتى الجفاف التام بالتخلص من ثنائي إيثيل الإيثر أو ثنائي كلورو ميثان، تم جمع البقايا (عموماً ذات شكل يشبه الطين) في زجاجة معقمة صغيرة بعد إذابتها في حجم صغير من ثنائي إيثيل الإيثر وتجفيفها باستخدام الهواء في وعاء التبخير (Air from a fume cupboard) حتى يتبخر ثنائي إيثيل الإيثر (Alabouvette، 2009).

13.3 تقييم النشاط المضاد للفطريات

تم زراعة فطر *Fusarium* و *Verticillium* على PDA عند 25 درجة مئوية لمدة 6 أيام (Bell وآخرون، 1982) والحصول على أبواغ الفطر عن طريق إضافة 10 مل من الماء المقطر المعقم إلى كل طبق وتعليق الأبواغ باستخدام قضيب زجاجي معقم، تم بعد ذلك ترشيح المعلق إلى أنبوب اختبار معقم، تم حساب عدد الأبواغ باستخدام جهاز قياس الكريات الدموية Haemocytometer وتعديلها إلى 10^5 كونيديا مل⁻¹، تم استخدام (0.1 مل) من معلق الأبواغ وطرحه على سطح الوسط المغذي، وإزالة 4 من أقراص الاجار (قطرها 4 مم) من أطباق الوسط المغذي PDA الملقحة باستخدام ثاقبة فلين معقم.

حسب طريقة Dennis و Webster (1971b)، تم تعليق المتبقيات من المستخلصات الحمضية والقاعدية والمتعادلة في 10% (v / v) ثنائي ميثيل سلفوكسيد (DMSO) في الماء المقطر المعقم وتقييمها للنشاط المضاد للفطريات، باستخدام المذيب (ثنائي ميثيل سلفوكسيد) كشاهد وتم إضافة 40 ميكرو لتر من المستخلصات إلى الحفر، واستخدمت أربعة مكررات لكل عذلة وحُضنت الأطباق عند 15 درجة مئوية لمدة 7 أيام، تم الكشف عن النشاط المضاد للفطريات بظهور منطقة تثبيط واضحة حول الحفر.

14.3 الفصل الكروماتوغرافي الغازي Gas Chromatograph Derivatisation

استخدم كروماتوغرافيا الغاز / قياس الطيف الكتلي (GC / MS)، بأسترة عينات المتجزئات (الحامضية والقاعدية والمتعادلة) عن طريق إذابة في خمس قطرات من كل من البيريدين pyridine وخليط من (ثلاثي ميثيل سيليل trimethylsilyl) ثلاثي فلورو أسيتاميد trifluoroacetamide وثنائي ميثيل كلورو سيلان trimethylchlorosilane (BSTFA) (99:1 حجم/حجم)، تم ترك المحلول في أنبوب صمامي مغلق لمدة 5 أيام في درجة حرارة الغرفة في الظلام. تبخر المذيب بعد ذلك في الفراغ وتم إضافة بييريدين (0.3 مل) إلى المستخلصات لإذابة العينة (Dubey وآخرون، 2007).

15.3 أدوات وشروط كروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة

تحليل العينات المشتقة باستخدام نظام كمبيوتر GC-MS، استخدم كروماتوجراف الغاز (GC) هو (Hewlett-Packard 5890 Series II) المزودة بعمود شعري سيليك مدمج بسمك 25 م × 0.32 مم × 0.52 ميكرومتر. سمك الفيلم DB-5، تم ضبط درجة حرارة المصدر

عند 50 درجة مئوية، وتأخير المذيب وضبط عند 1.5 دقيقة، كانت درجة حرارة خط النقل المتصل بـ GC مع MS 280 درجة مئوية (Faruk وآخرون، 2002)

برمجت درجة حرارة العمود على 120 درجة مئوية / دقيقة واحدة وترفع إلى 260 درجة مئوية عند 10 درجة مئوية لكل دقيقة. تم استخدام الهيليوم عالي النقاء بسرعة خطية 38 سم s-1 كغاز حامل، درجة حرارة وواجهة الحاقن كانت 270 درجة مئوية، بينما حجم العينة المحقونة كان 1.0 مل، مطياف الكتلة (MS) عبارة عن VG Trio-2 مع تأين إلكتروني (EI) وضع المسح (1-sec amu 40–550) بجهد مؤين (70ev) (Hajieghrari وآخرون، 2008)

16.3 تحديد المركبات المضادة للفطريات بواسطة GC / MS

حددت المركبات المفصولة كروماتوغرافياً عن طريق البحث في قاعدة بيانات المكتبة الطيفية. وتم إجراء التحديد النهائي للمركبات في عينات الاستخراج عن طريق مطابقة أوقات استبقاء GC وأطياف الكتلة مع المركبات المعروفة في مكتبة المستخدم.

اعتمد تحديد المركبات على 90% من التشابه بين أطياف MS للمركبات غير المعروفة

والمرجعية في مكتبة أطياف MS (Monte، 2001)

17.3 التجارب والتحليل الإحصائي

أساليب تحليل البيانات:

لتحليل بيانات العينة، تم استخدام الأسلوب الإحصائي الوصفي والتحليلي من أجل تحليل البيانات واختبار الفرضيات وذلك باستخدام برنامج الحزم الإحصائية للعلوم الاجتماعية Statistical Package for Social Sciences (SPSS V25) (SPSS V25، 2017) إذ تم

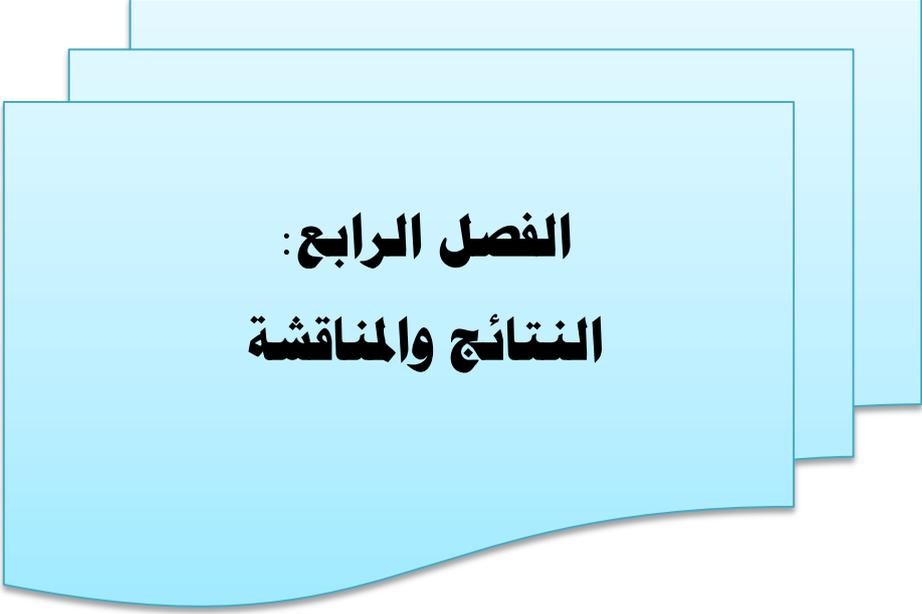
استخدام الوسائل التالية:

1- الإحصاء الوصفي:

- الرسومات البيانية متمثلة في الأعمدة البيانية.
- المتوسطات الحسابية والانحرافات المعيارية والنسب المئوية.

2- الاستدلال الإحصائي والمتمثل في:

- اختبار تحليل التباين الأحادي One Way ANOVA لاختبار الفروق بين المعاملات.



الفصل الرابع:
النتائج والمناقشة

4. النتائج والمناقشة

1.4 عزل وتعريف فطر *Trichoderma*

عُزل الفطر من التربة الملتصقة بجذور شتلات نبات الزيتون بطريقة التخفيف المتسلسل على الوسط الانتقائي (شكل 1.4) حسب طريقة Akrami وآخرون، (2011)؛ Askew و Laing، (1993).

تم الحصول على 11 عزلة بناءً على خصائص المزرعة، ورمز لها T1، T2، T3، T4، T5، T6، T7، T8، T9، T10، T11 واختبرت على ثلاث أوساط مغذية مختلفة وهي وسط آجار دكستروز البطاطس والتمر ونواة التمر، أظهرت 8 عزلات فقط فاعلية التضاد في المختبر، وعرفت على مستوى النوع بواسطة الخصائص المظهرية والمجهريّة بتعاون مع الدكتور أحمد نوح بمركز البحوث الزراعية بالقاهرة جدول (1.4)، وهي ثلاث عزلات عرفت على أنها *Trichoderma viride* (T1، T4، T7) رغم الاختلافات القليلة في شكل المزرعة لحساسية فطر *Trichoderma* للوسط الأصلي لها، *Trichoderma koningiopsis* (T2)، *Trichoderma reesei* (T3)، *Trichoderma spp* (T6)، *Trichoderma harzianum* (T5) لم تعرف لمستوى النوع، *Trichoderma aureoviride* (T8).



شكل (1.4) نمو *Trichoderma* على الوسط الانتقائي

جدول (1.4): تعريف عزلات فطر *Trichoderma* على مستوى النوع بواسطة الخصائص المظهرية والمجهرية.

لون المستعمرة	لون المعاكس للمستعمرات	خصائص الحامل الكونيدي	شكل الذنبيات	شكل الكونيديا	العزلة
أخضر غامق	أخضر باهت الي اخضر مزرق	عديم اللون	طويلة المتفرعة بشكل غير منتظم ويكون على شكل فيرتيسيلات (الزهرات)	كروية إلى بيضوية الشكل	<i>T. viride</i> (T1)
أخضر باهت الي اخضر مزرق	أخضر باهت الي اخضر مزرق	عديم اللون	نادراً متفرعة وتكون في شكل حلقات	شبه أسطواني إلى بيضاوي الشكل	<i>T.koningiopsis</i> (T2)
منشرة في تجمعات صغيرة ولون أخضر أصفر باهت	منشرة في تجمعات صغيرة ولون أخضر أصفر باهت	أصفر شاحب	نادراً متفرعة وتكون في شكل حلقات	بيضاوي الشكل	<i>T. reesei</i> (T3)
أخضر مزرق	أخضر مزرق	غير ملون	قليلة التفرع وتكون على شكل زهرات	كروية إلى بيضوية	<i>T.viride</i> (T4)
أخضر الداكن تنتج تجمعات على شكل عناقيد أو بثور محاطة بشعيرات فطرية	أخضر الداكن تنتج تجمعات على شكل عناقيد أو بثور محاطة بشعيرات فطرية	أصفر باهت	كثيرة التفرع وتكون على شكل زهرات	شبه كروي إلى بيضاوي	<i>T.harzianum</i> (T5)
بيضاء	بيضاء	أبيض	-	لا توجد كونيديا	<i>Trichoderma</i> spp (T6)
أخضر مزرق داكن	أخضر مزرق داكن	غير ملون	قليلة الفروع والتفرع بشكل منتظم على هيئة زهرات	كروية إلى بيضوية الشكل	<i>T.viride</i> (T7)
خضراء باهتة مع وجود بثور متفرقة	خضراء باهتة مع وجود بثور متفرقة	تغير اللون	قليلة التفرع مع شكل هرمي	بيضوية طرفها ضيقة طرفيا القمي أعرض من ومتباعدة القاعدي	<i>T. aureoviride</i> (T8)

2.4 عزل وتعريف الفطريات الممرضة *V. dahliae* و *F. oxysporum*

عُزلت الفطريات الممرضة من الجذور وقاعدة الساق لشتلات نبات الزيتون المصابة وتم الحصول على عزله واحدة لكل فطر ممرض *F. oxysporum* و *V. dahliae* وتم تعريفها على مستوى النوع بواسطة الخصائص المظهرية والمجهرية، كان شكل المستعمرة لفطر *F. oxysporum* قطني أبيض كثيف النمو ذات سطح سفلي وردي داكن على الوسط المغذي آجار دكستروز البطاطس، أنتجت

العزلة أبواغ كونيدية صغيرة *Microconidia* وفيرة، والتي كانت بيضوية إلى كلبية الشكل وغير مقسمة بجواجز عرضية، تم إنتاجها على حوامل كونيدية أحادية قصيرة، الأبواغ الكلاميدية البينية كانت وفيرة، ومفردة كما وصفها (Nawade وآخرون، 2017) بينما كانت الأبواغ الكونيدية الكبيرة *Macroconidia* هلالية الشكل منحنية قليلا، رقيقة الجدران، ومقسمة بجواجز عرضية 2-3 (Patra و Biswas، 2017).

أما فطر *V. dahlia* أظهرت المزرعة الفطرية نمو فطري قطني أبيض إلى أخضر غامق تدريجيا حيث تم إنتاج الميكروسكليروتيا، بعد حوالي 7 أيام بعد الحضانة، خلال هذه الفترة، كانت الكونيديا شفافة بيضاوية الشكل، أحادية الخلية مصفوفة في مجموعات على الذنبيات الموجودة في ترتيب دائري على شكل زهرات " فيرتيسيلات " من 2-4 ذنبيات لكل عقدة على حوامل كونيدية هوائية متفرعة. كانت ميكروسكليروتيا بنية داكنة إلى سوداء، كروية ومدمجة مع بعض، مغمورة في الوسط المغذي، يبلغ قطرها من 20 إلى 100 مم، تم تطورت الى مجاميع يصل قطرها إلى 200 مم، هذه الخصائص تتناسب مع *V. dahliae* كما وصفها (Collins وآخرون، 2003)



شكل (3.4) عزلة نقية لفطر *Verticillium dahliae*

شكل (2.4) عزلة نقية لفطر *Fusarium oxysporum*

3.4 اختبار القدرة الإراضية لفطر *V. dahliae* و *F. oxysporum*

بعد أربعة أسابيع من التلقيح، ظهرت أعراض الإصابة بتلون النبات بالأخضر المصفر وتدهور وذبول النبات بشكل واضح مقارنة بالشاهد التي لم تظهر عليه أي أعراض مرضية، أمكن إعادة عزل الفطريات من النباتات الملقة ولم يتم عزل أي من الفطريات من الشاهد.

4.4 اختبار التضاد الحيوي المزدوج على الأوساط المغذية لعزلات فطر *Trichoderma* ضد فطر

F. oxysporum

1.4.4 تأثير الأوساط المغذية على عزلات فطر *Trichoderma* في اختبار التضاد الحيوي

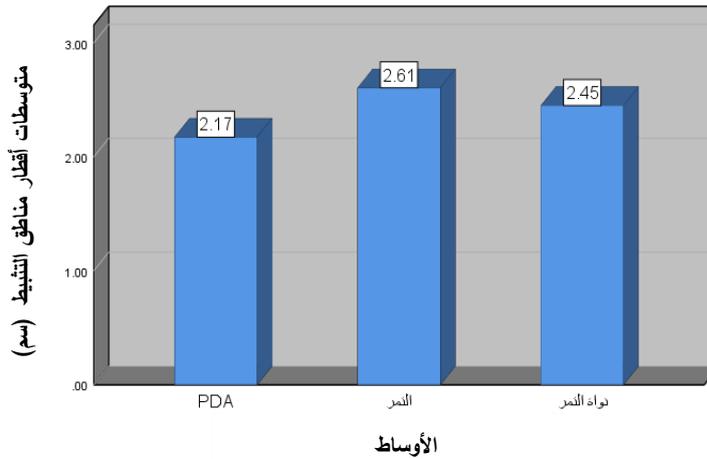
F. oxysporum المزدوج على تثبيط نمو فطر

أظهرت النتائج لعدد 8 عزلات لفطر *Trichoderma* على قدرتها في التضاد المباشر لفطر *F. oxysporum* على أوساط مغذية مختلفة كما بين في الجدول (2.4)، أظهرت نتائج الاختبار قدرة الفطر المضاد على تثبيط نمو الفطر الممرض على جميع أنواع الأوساط المغذية المستخدمة في هذا الاختبار، حيث كان مستوى التثبيط على وسط اجار دكستروز البطاطس 2.17 سم وعلى وسط التمر بمتوسط 2.61 سم بينما على وسط نواة التمر كان متوسط التثبيط 2.45 سم، وأظهر التحليل الاحصائي انه لا يوجد فروقات معنوية بين الأوساط الثلاثة المستخدمة، رغم عدم وجود فروق معنوية بين الأوساط المغذية المختلفة إلا أنه قد تكون النواتج الايضية المسؤولة على التثبيط على الأوساط المغذية المختبرة مختلفة ومتساوية في الفاعلية، هذا يتوافق مع الدراسة التي قام بها Gezgin وآخرون، (2020) والتي أظهرت كلا النوعين المختبرين لفطر *Trichoderma* (*T. atroviride* و *T. citrinoviride*) لم تكن هناك فروق ذات دلالة إحصائية

جدول (2.4): تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *Fusarium oxysporum* (سم)

P-value	F test	الانحراف المعياري	±	المتوسط (سم)	الوسط
0.065	2.829	0.79	±	2.17 ^a	PDA
		0.73	±	2.61 ^a	التمر
		0.47	±	2.45 ^a	نواة التمر

a : لا توجد فروقات معنوية بين الأوساط



شكل (4.4) تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *Fusarium oxysporum* (سم)

2.4.4 تأثير عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *F. oxysporum*

أوضحت النتائج كما مبين في الجدول (3.4) أن 8 عزلات لفطر *Trichoderma* لها القدرة

على تثبيط فطر *F. oxysporum* وكانت العزلات (*T. viride* (T1) ، *T. koningiopsis* و *T. reesei*

هي أفضل العزلات في التثبيط ولا توجد فروقات معنوية بينهم وكانت *T. koningiopsis*

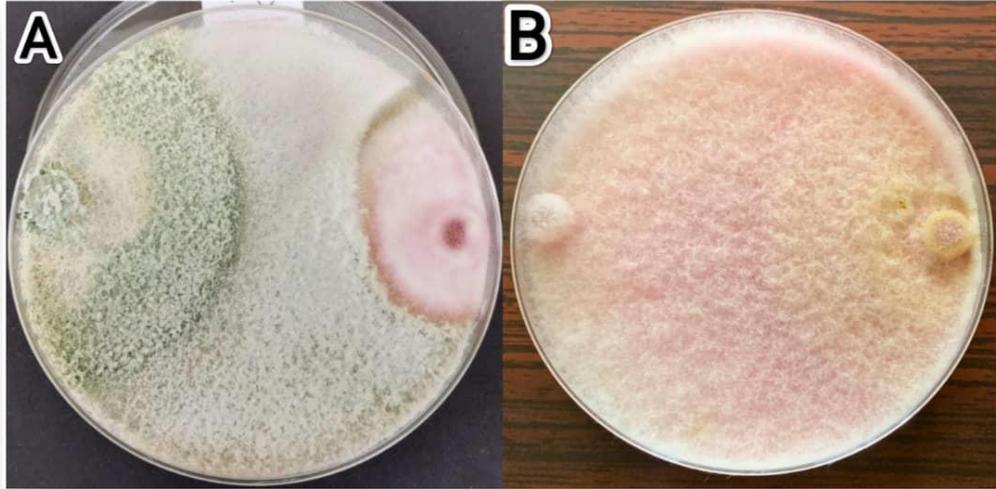
بمتوسط 1.82 سم ونسبة مئوية 50.8% وتليها العزلة (*T. viride* (T1) بمتوسط 1.91 سم ونسبة

مئوية 48.4% ثم *T. reesei* بمتوسط 1.98 سم ونسبة مئوية 46.5% مقارنة بالشاهد الذي كان

بمتوسط 3.70 سم ونسبة مئوية 0.0%، هذا يتفق مع الدراسة التي قام بها Modrzewska وآخرون،

(2022)، التي لخص فيها أن نسبة التثبيط لفطر الفيوزاريوم كانت من 24 إلى 66% وذلك باختلاف

نوع العزلة لفطر *Trichoderma*.



شكل (5.4) اختبار التضاد الحيوي المزدوج لفطر *Trichoderma* على فطر *Fusarium oxysporum*. (A)

تقابل الفطر الممرض والفطر المضاد على نفس طبق PDA في اليوم السادس من التحضين (B) وجود الفطر

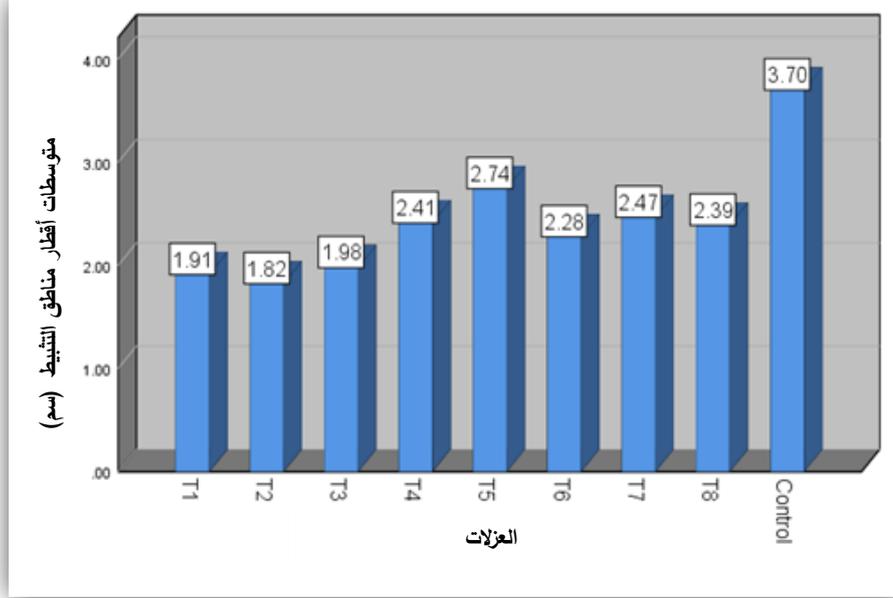
الممرض (الشاهد) في غياب الفطر المضاد على طبق PDA في اليوم السادس من التحضين

جدول (3.4): متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Fusarium oxysporum* (سم).

P value	F test	نسبة التثبيط	الانحراف المعياري	±	المتوسط (سم)	العزلة
0.000	13.672**	%0.0	0.45	±	3.70 ^a	Control
		%48.4	0.46	±	1.91 ^{be}	<i>T. viride</i> (T1)
		%50.8	0.60	±	1.82 ^b	<i>T. koningiopsis</i> (T2)
		%46.5	0.25	±	1.98 ^{bce}	<i>T. reesei</i> (T3)
		%34.9	0.25	±	2.41 ^{de}	<i>T. viride</i> (T4)
		%25.9	0.29	±	2.74 ^d	<i>T. harzianum</i> (T5)
		%38.4	0.62	±	.28 ^{cef}	<i>Trichoderma</i> spp (T6)
		%33.2	0.31	±	2.47 ^{df}	<i>T. viride</i> (T7)
%35.4	0.67	±	2.39 ^{cd}	<i>T. aureoviride</i> (T8)		

a, b, c, d, e, f الفروقات المعنوية بين العزلات، المشاركة في حرف واحد أو أكثر يعني عدم وجود فروقات

معنوية.



شكل (6.4) متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Fusarium oxysporum* (سم)

5.4 اختبار التضاد الحيوي للمركبات المتطايرة بطريقة الأطباق المقلوبة على الأوساط المغذية

لعزلات فطر *Trichoderma* ضد فطر *F. oxysporum*

1.5.4 تأثير الأوساط المغذية على فاعلية عزلات فطر *Trichoderma* في إنتاج المركبات

المتطايرة لتثبيط نمو فطر *F. oxysporum*

توضح النتائج تأثير الوسط في اختبار الأطباق المقلوبة في الجدول (4.4) بين عزلات من

فطر *Trichoderma* وعزله من *F. oxysporum* على أوساط مغذية مختلفة وسط اجار دكستروز

البطاطس وسط التمر ووسط نواة التمر كان التثبيط على هذه الأوساط الثلاثة لا توجد فروقات معنوية

بينهم فكان وسط التمر بمتوسط 2.40 سم ووسط اجار دكستروز البطاطس بمتوسط 2.43 سم ووسط

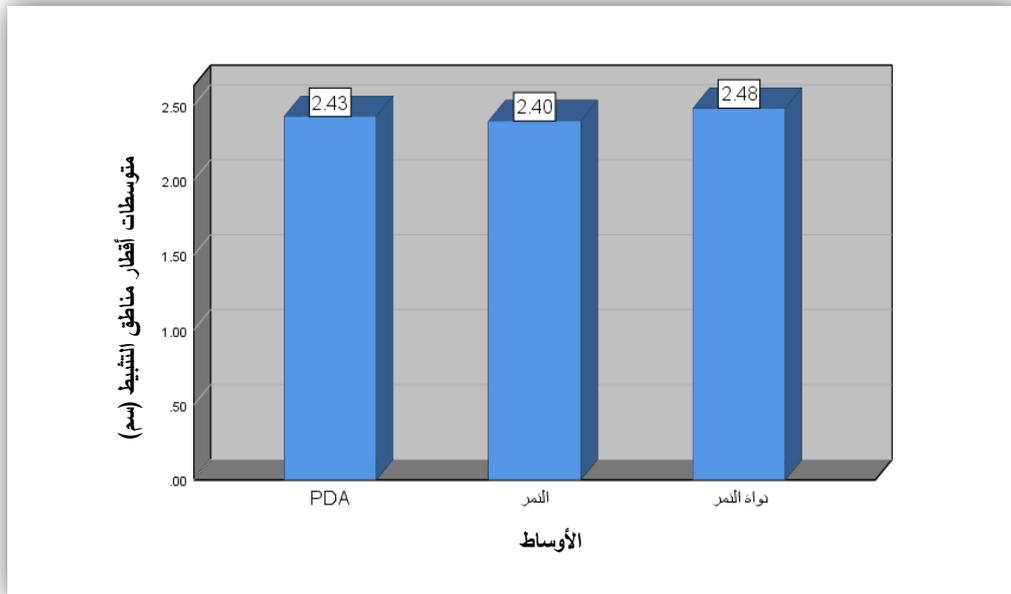
نواة التمر بمتوسط 2.48 سم.

جدول (4.4): تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *Fusarium*

(سم) *oxysporum*

P-value	F test	الانحراف المعياري	±	المتوسط (سم)	الوسط
0.804	0.219	0.57	±	2.43 ^a	PDA
		0.48	±	2.40 ^a	التمر
		0.37	±	2.48 ^a	نواة التمر

a: لا توجد فروقات معنوية بين الأوساط.



شكل (7.4) تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *Fusarium*

(سم) *oxysporum*

2.5.4 تأثير عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *F. oxysporum*

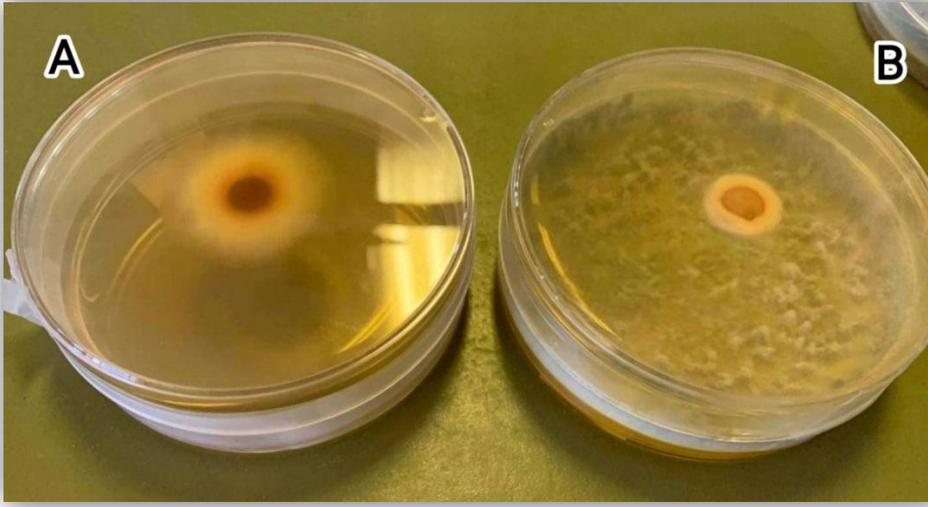
أوضحت النتائج تأثير نوع العزلة في الجدول (5.4) للاختبار الأطباق المقلوبة أن 8 عزلات

لفطر *Trichoderma* لها القدرة على تثبيط فطر *F. oxysporum*، وكان العزلة *T. aureoviride*

هي أفضل العزلات في التثبيط بمتوسط 1.93 سم وبنسبة مئوية 42.9% مقارنة بالشاهد الذي كان

بمتوسط 3.38 سم وبنسبة مئوية 0.0% ولها فروقات معنوية بينها وبين باقي العزلات الأخرى باستثناء

العزلة *T. reesei* التي كانت بمتوسط 2.09 سم وبنسبه مئوية 38.2% مقارنة بالشاهد بينما كانت العزلة *T. harzianum* هي أقل العزلات في التثبيط بمتوسط 2.79 سم وبنسبه مئوية 17.5% مقارنة بالشاهد، وهذا يتفق مع الدراسة التي قام بها Kumar وآخرون، (2019) التي أشار فيها إلى أن المركبات المتطايرة لفطر *T. harzianum* أظهرت تثبيط قوي وصل الى 79.25% مقارنة بالأنواع الأخرى.

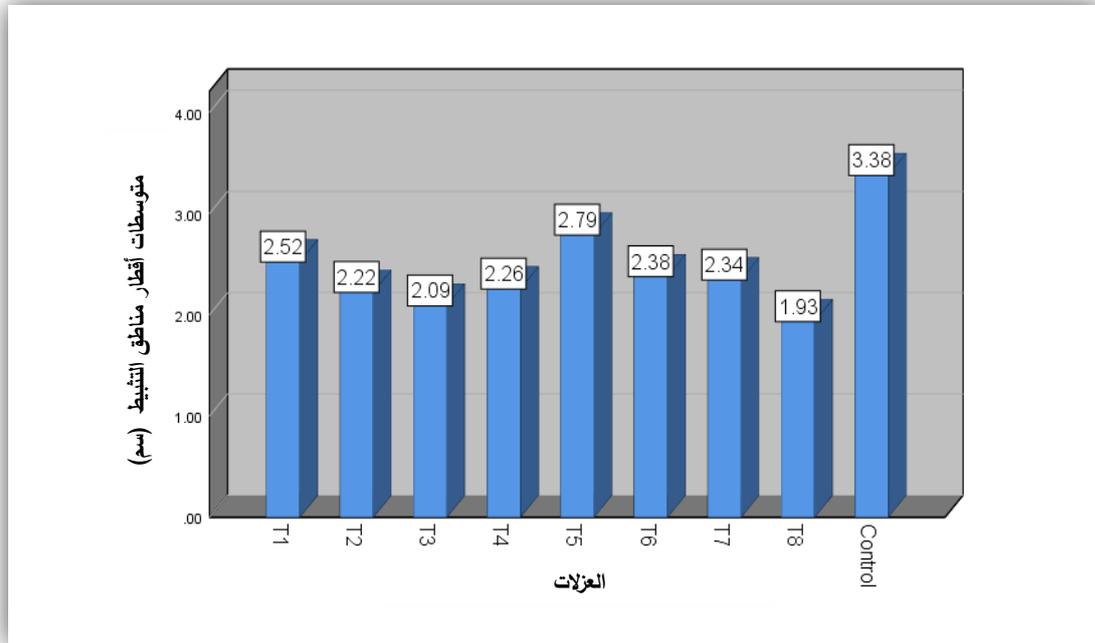


شكل (8.4) اختبار التضاد الحيوي للمركبات المتطايرة بطريقة الاطباق المقلوبة لعزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط فطر *Fusarium oxysporum* (A) طبق معاملة الشاهد اليوم الثالث من التحضين. (B) طبق المعاملة الفطر المضاد في وجود الفطر الممرض في اليوم الثالث من التحضين.

جدول (5.4): متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Fusarium oxysporum* (سم)

P-value	F test	نسبة التثبيط	الانحراف المعياري	±	المتوسط (سم)	العزلة
0.000	25.303**	%0.0	0.22	±	3.38 ^a	Control
		%25.4	0.31	±	2.52 ^{bg}	<i>T. viride</i> (T1)
		%34.3	0.34	±	2.22 ^{cg}	<i>T. koningiopsis</i> (T2)
		%38.2	0.08	±	2.09 ^{cde}	<i>T. reesei</i> (T3)
		%33.1	0.37	±	2.26 ^{cdg}	<i>T. viride</i> (T4)
		%17.5	0.23	±	2.79 ^f	<i>T. harzianum</i> (T5)
		%29.6	0.21	±	2.38 ^{bg}	<i>Trichoderma</i> spp (T6)
		%30.8	0.13	±	2.34 ^{bg}	<i>T. viride</i> (T7)
%42.9	0.29	±	1.93 ^e	<i>T. aureoviride</i> (T8)		

a, b, c, d, e, f, g الفروقات المعنوية بين العزلات، المشاركة في حرف واحد أو أكثر يعني عدم وجود فروقات معنوية.



شكل (9.4) متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Fusarium oxysporum* (سم)

6.4 اختبار التضاد الحيوي للمركبات غير المتطيرة بطريقة غشاء السلوفان على الأوساط المغذية

لعزلات فطر *Trichoderma* ضد فطر *F. oxysporum*

1.6.4 تأثير الأوساط المغذية على فاعلية عزلات فطر *Trichoderma* في إنتاج المركبات غير

المتطيرة لتثبيط نمو فطر *F. oxysporum*

توضح النتائج تأثير اختلاف الوسط في اختبار غشاء السلوفان في الجدول (6.4) بين عزلات

من فطر *Trichoderma* وفطر *F. oxysporum* عند تنميتها على أوساط مغذية مختلفة وسط

آجار دكستروز البطاطس وسط التمر ووسط نواة التمر كان التثبيط على هذه الأوساط الثلاثة لا توجد

فروقات معنوية بينهم فكان وسط التمر بمتوسط 2.62 سم ووسط نواة التمر بمتوسط 2.62 سم ووسط

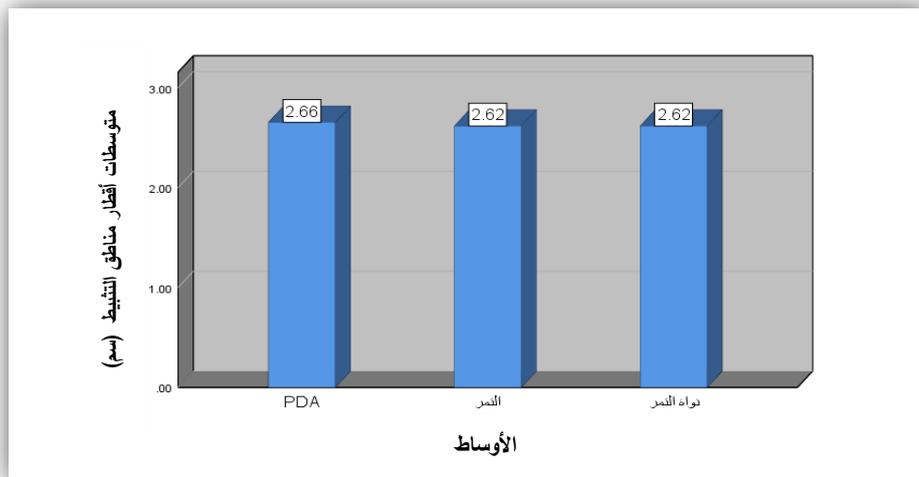
آجار دكستروز البطاطس بمتوسط 2.66 سم

جدول (6.4): تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *Fusarium*

oxysporum (سم)

P-value	F test	الانحراف المعياري ±	المتوسط (سم)	الوسط
0.961	0.039	± 0.55	2.66 ^a	PDA
		± 0.62	2.62 ^a	التمر
		± 0.50	2.62 ^a	نواة التمر

a: لا توجد فروقات معنوية بين الأوساط.



شكل (10.4) تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *Fusarium*

oxysporum (سم)

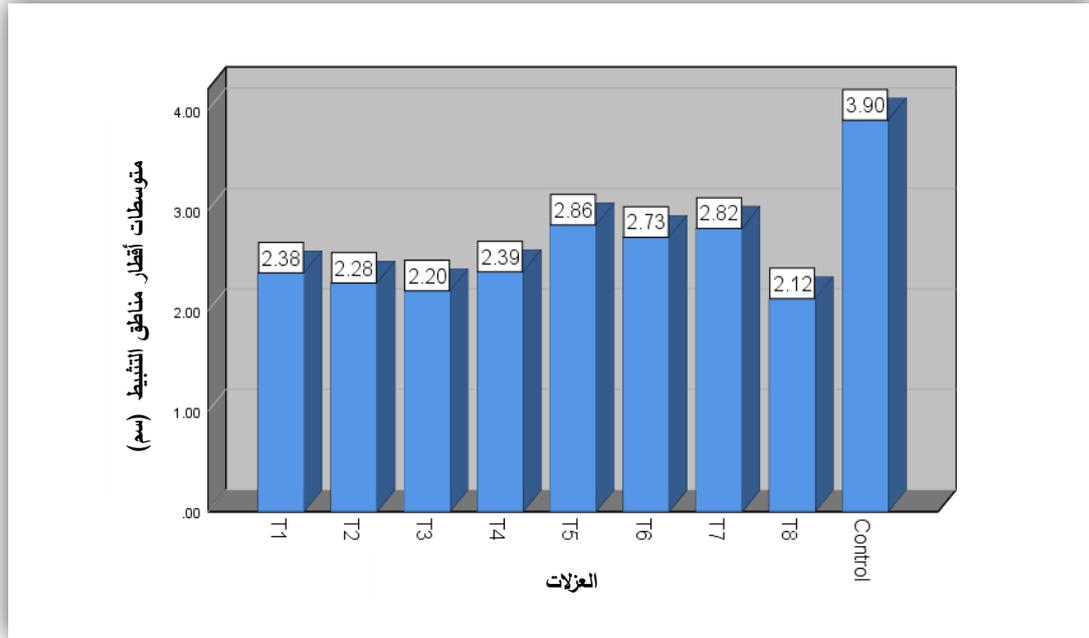
2.6.4 تأثير عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *F. oxysporum*

أوضحت نتائج تأثير نوع العزلة للمركبات غير المتطايرة والمبيئة في الجدول (7.4) أن 8 عزلات لفطر *Trichoderma* لها القدرة على تثبيط فطر *F. oxysporum* وكانت العزلات *T. aureoviride* و *T. reesei*، *koningiopsis* هي أفضل العزلات في التثبيط ولا توجد فروقات معنوية بينهم وكانت *T. aureoviride* هي الأفضل نسبياً بمتوسط 2.12 سم ونسبة مئوية 54.6% وتليها العزلة *T. reesei* بمتوسط 2.20 سم ونسبة مئوية 43.6% و *T. koningiopsis* بمتوسط 2.28 سم ونسبة مئوية 41.5% مقارنة بالشاهد الذي كان بمتوسط 3.90 سم ونسبة مئوية 0.0% وهذا يتفق مع الدراسة التي قام بها Chakrabrty و Chatterjee سنة (2008) إن أنواع من التريكوثيرما *T. lignorum* و *T. viride*، *T. hamatum*، *T. reesei*، *T. harzianum* لها قدرة عالية في تثبيط نمو فطر *F. solani* بنسبة تصل إلى 100% وأشار أن المركبات غير المتطايرة لها تأثير أفضل من المركبات المتطايرة في تثبيط نمو العامل الممرض.

جدول (7.4): متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Fusarium Oxysporum* (سم)

P value	F test	نسبة التثبيط	الانحراف المعياري	±	المتوسط (سم)	العزلة
0.000	67.187**	%0.0	0.20	±	3.90 ^a	Control
		%39.0	0.22	±	2.38 ^b	<i>T. viride</i> (T1)
		%41.5	0.17	±	2.28 ^b	<i>T. koningiopsis</i> (T2)
		%43.6	0.14	±	2.20 ^{bd}	<i>T. reesei</i> (T3)
		%38.7	0.27	±	2.39 ^{be}	<i>T. viride</i> (T4)
		%26.7	0.16	±	2.86 ^c	<i>T. harzianum</i> (T5)
		%30.0	0.33	±	2.73 ^c	<i>Trichoderma</i> spp (T6)
		%27.7	0.10	±	2.82 ^c	<i>T. viride</i> (T7)
		%45.6	0.11	±	2.12 ^b	<i>T. aureoviride</i> (T8)

a, b, c, d الفروقات المعنوية بين العزلات، المشاركة في حرف واحد أو أكثر يعني عدم وجود فروقات معنوية.



شكل (11.4) متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Fusarium Oxysporum* (سم)

7.4 اختبار التضاد الحيوي المزدوج على الأوساط المغذية لعزلات فطر *Trichoderma* ضد فطر

Verticillium dahliae

1.7.4 تأثير الأوساط المغذية على عزلات فطر *Trichoderma* في اختبار التضاد الحيوي

المزدوج على تثبيط نمو فطر *V. dahliae*

أظهرت نتائج قدرة التضاد المباشر في الجدول (8.4) بين 8 عزلات لفطر *Trichoderma*

ضد فطر *V. dahliae* على أوساط مغذية مختلفة وسط دكستروز البطاطس وسط التمر ووسط نواة

التمر في المختبر لليوم السادس، كان التثبيط على وسط التمر بمتوسط 2.70 سم ووسط نواة التمر

بمتوسط 2.77 سم وسط دكستروز البطاطس بمتوسط 2.94 سم ولا توجد فروقات معنوية بينهم، في عدة

دراسات أثبت فطر *Trichoderma* فاعلية كبيرة في مكافحة فطر *Verticillium* على العديد من

النبات الحولية والنباتات الخشبية المعمرة (Deketelaere وآخرون، 2017) ومن أهمها أشجار

الزيتون كما في الدراسة التي قام بها Carrero-Carrón وآخرون، (2016) التي أثبت فيها فاعلية

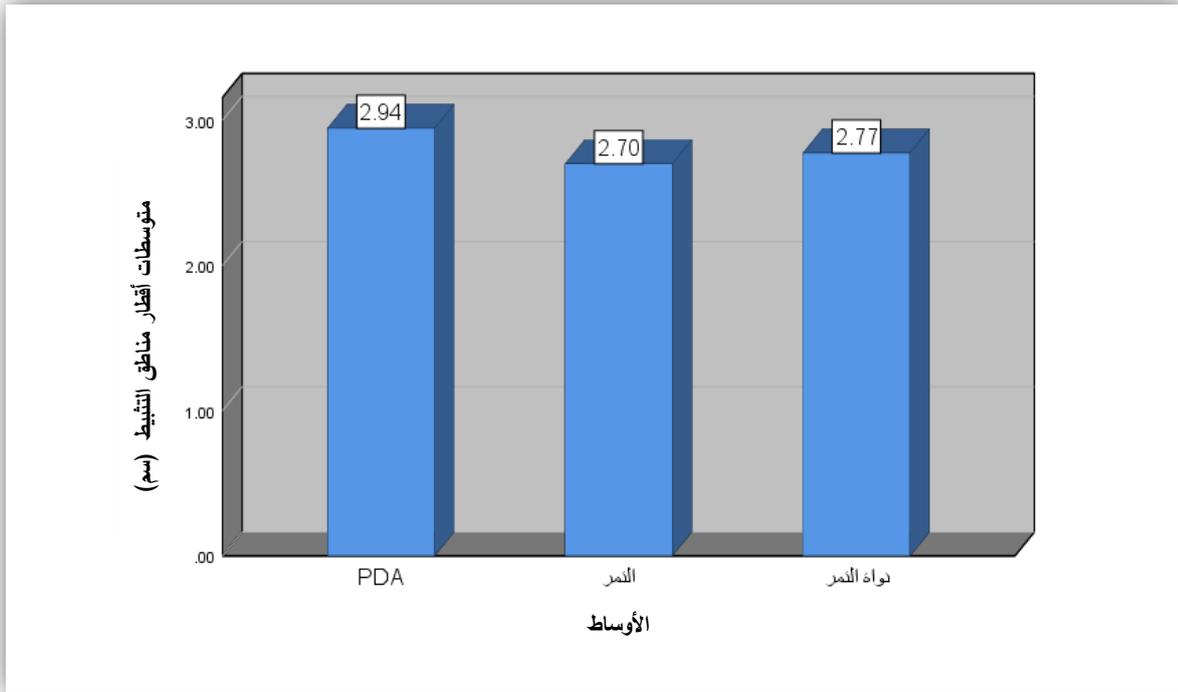
كبيرة معمليا وفي الحقل لفطر *Trichoderma* في مكافحة *V. dahliae* المسبب للذبول على أشجار الزيتون.

جدول (8.4): تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر

Verticillium dahliae (سم)

P-value	F test	الانحراف المعياري	±	المتوسط(سم)	الوسط
0.729	0.317	1.26	±	2.94 ^a	PDA
		0.70	±	2.70 ^a	التمر
		1.39	±	2.77 ^a	نواة التمر

a: لا توجد فروقات معنوية بين الأوساط.



شكل (12.4) تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر

Verticillium dahliae (سم)

2.7.4 تأثير عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *V. dahliae*

أوضحت نتائج في الجدول (9.4) تأثير نوع 8 عزلات لفطر *Trichoderma* وقدرتها على تثبيط فطر *V. dahliae* وكانت العزلات *T. reesei*، *T. viride* (T4) و *T. harzianum* هي أفضل العزلات في تثبيط الفطر الممرض رغم التقارب الشديد مع العزلات الأخرى *T. viride* (T1)، *Trichoderma spp*، *T. viride* (T7) و *T. aureoviride* ذلك لعدم وجود فروقات معنوية بينهم، فكانت العزلة *T. reesei* بمتوسط 2.12 سم ونسبه مئوية 62.1% وتليها العزلة *T. viride* بمتوسط 2.16 سم ونسبه مئوية 61.4% ثم العزلة *T. harzianum* بمتوسط 2.18 سم ونسبة مئوية 61.1% مقارنة بالشاهد الذي كان بمتوسط 5.60 سم ونسبة مئوية 0.0%، بينما كانت العزلة *T. koningiopsis* لها اقل نسبة تثبيط للفطر *V. dahliae* بمتوسط 3.19 سم ونسبة مئوية 43.0% مقارنة بالشاهد والتي لها فروقات معنوية بينها وبين العزلات الأخرى، كما أشار Jabnoun-Khiareddine وآخرون، (2009) أن أنواع فطر *Trichoderma* التي استخدمها في مكافحة فطر *Verticillium* أظهرت تباينا كبيرا في نسبة التثبيط، وفي دراسة أخرى قام بها Fotoohiyan وآخرون، (2017) إن فطر *T. harzianum* له القدرة على تثبيط فطر *V. dahliae* بنسبة 52.7% في اختبار التضاد الحيوي المزدوج.

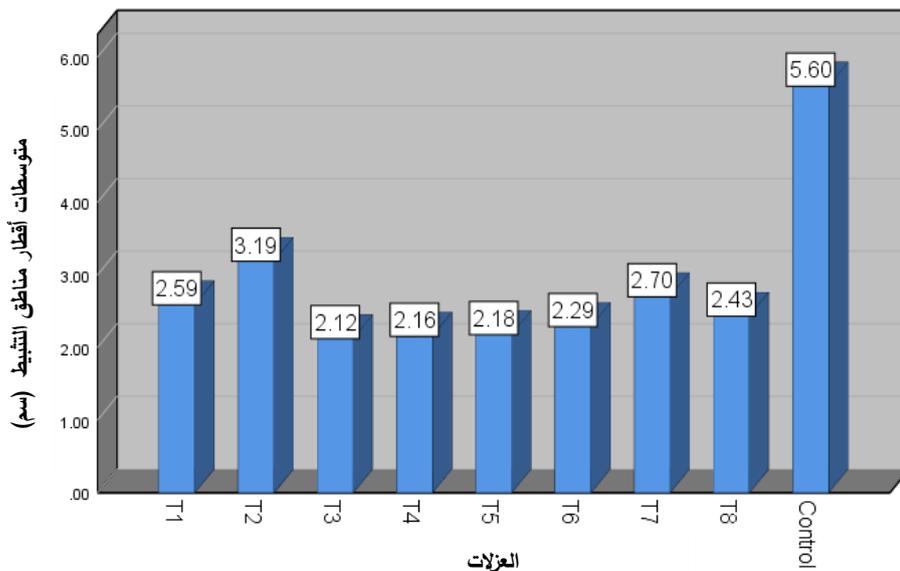


شكل (13.4) اختبار التضاد الحيوي المزدوج لعزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط فطر *Verticillium dahliae* (A) وجود الفطر الممرض والفطر المضاد على نفس الطبق. (B) طبق (الشاهد) وجود الممرض وغياب فطر المضاد.

جدول (9.4): متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Verticillium dahliae* (سم)

P-value	F test	نسبة التثبيط	الانحراف المعياري	±	المتوسط (سم)	العزلة
0.000	43.712 **	%0.0	1.25	±	5.60 ^a	Control
		%53.8	0.14	±	2.59 ^b	<i>T. viride</i> (T1)
		%43.0	0.48	±	3.19 ^c	<i>T. koningiopsis</i> (T2)
		%62.1	0.37	±	2.12 ^{bd}	<i>T. reesei</i> (T3)
		%61.4	0.13	±	2.16 ^{bd}	<i>T. viride</i> (T4)
		%61.1	0.22	±	2.18 ^{bd}	<i>T. harzianum</i> (T5)
		%59.1	0.42	±	2.29 ^{bde}	<i>Trichoderma</i> spp (T6)
		%51.8	0.19	±	2.70 ^{be}	<i>T. viride</i> (T7)
%56.6	0.14	±	2.43 ^{be}	<i>T. aureoviride</i> (T8)		

a, b, c, d, e الفروقات المعنوية بين العزلات، المشاركة في حرف واحد أو أكثر يعني عدم وجود فروقات معنوية.



شكل (14.4) متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Verticillium dahliae* (سم)

8.4 اختبار التضاد الحيوي للمركبات المتطايرة بطريقة الأطباق المقلوبة على الأوساط المغذية

لعزلات فطر *Trichoderma* ضد فطر *V. dahliae*

1.8.4 تأثير الأوساط المغذية على فاعلية عزلات فطر *Trichoderma* في إنتاج المركبات

المتطايرة لتثبيط نمو فطر *V. dahliae*

توضح النتائج تأثير الوسط في اختبار الأطباق المقلوبة في الجدول (10.4) بين عزلات فطر

Trichoderma وفطر *V. dahliae* على أوساط مغذية مختلفة وسط آجار دكستروز البطاطس

وسط التمر ووسط نواة التمر كان التثبيط على هذه الأوساط لا توجد فروقات معنوية بينهم كان وسط

التمر بمتوسط 3.69 سم ويلييه وسط نواة التمر بمتوسط 3.76 سم ثم وسط آجار دكستروز البطاطس

بمتوسط 3.78 سم، فقد أشار Kong وآخرون، (2022) على نجاح المركبات المتطايرة لفطر

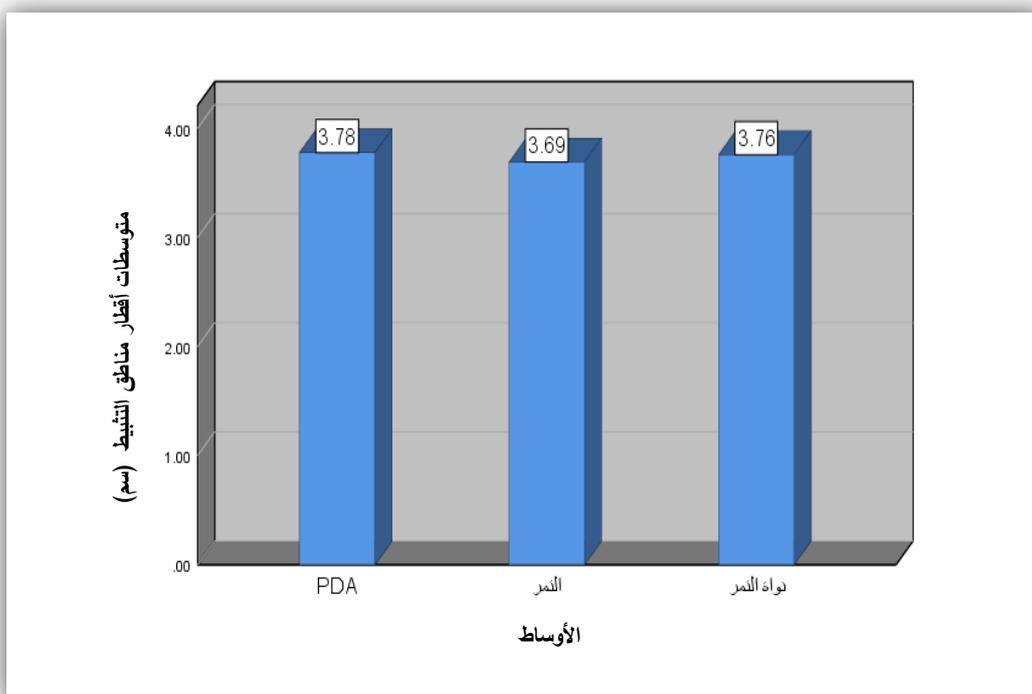
T. koningiopsis في تثبيط فطر *V. dahlia* الذي يسبب أمراض الذبول الوعائي للعديد من العوائل النباتية وقد قام بتعريف هذه المركبات باستخدام (GC/MS).

جدول (10.4): تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر

Verticillium dahliae (سم)

P-value	F test	الانحراف المعياري	±	المتوسط(سم)	الوسط
0.734	0.311	0.37	±	3.78 ^a	PDA
		0.47	±	3.69 ^a	التمر
		0.40	±	3.76 ^a	نواة التمر

a: لا توجد فروقات معنوية بين الأوساط.

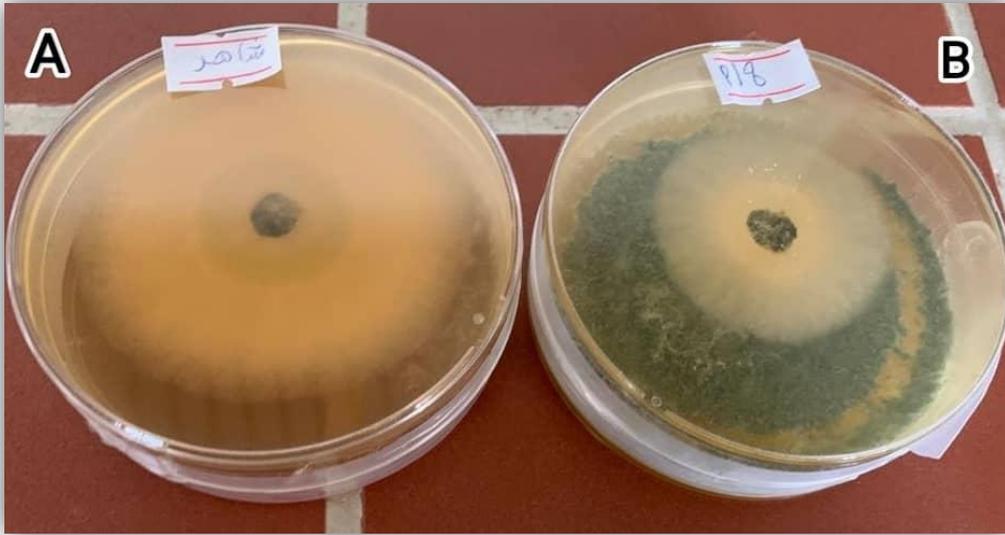


شكل (15.4) تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر

Verticillium dahliae (سم)

2.8.4 تأثير عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *V. dahliae*

وبينت النتائج تأثير نوع العزلة في الجدول (11.4) للاختبار الأطباق المقلوبة للمركبات المتطايرة أن 4 عزلات لفطر *Trichoderma* لها القدرة على تثبيط فطر *V. dahliae* هي *T. viride* (T1) ، *T. reesei* ، *T. viride* (T4) و *T. harzianum* وكانت العزلات *T. viride* (T4) و *T. harzianum* أفضل العزلات في التثبيط وبنسبه مئوية 23.4% و 19.8% مقارنة بالشاهد الذي كان بنسبة مئوية 0.0% ولا توجد فروقات معنوية بينهم، أما العزلة *T. viride* (T1) كانت أقل العزلات في التثبيط بمتوسط 3.78 سم ونسبة مئوية 7.8% بينما العزلات *T. koningiopsis* ، *Trichoderma spp* ، *T. viride* (T7) و *T. aureoviride* لم تظهر أي فاعلية في التثبيط مقارنة بالشاهد. أشار Benouzza وآخرون، (2020) أن المركبات المتطايرة التي تنتجها *T. atroviride* و *T. harzianum* أظهرت تثبيط بنسبة 69.33% و 64% لفطر *V. dahliae*

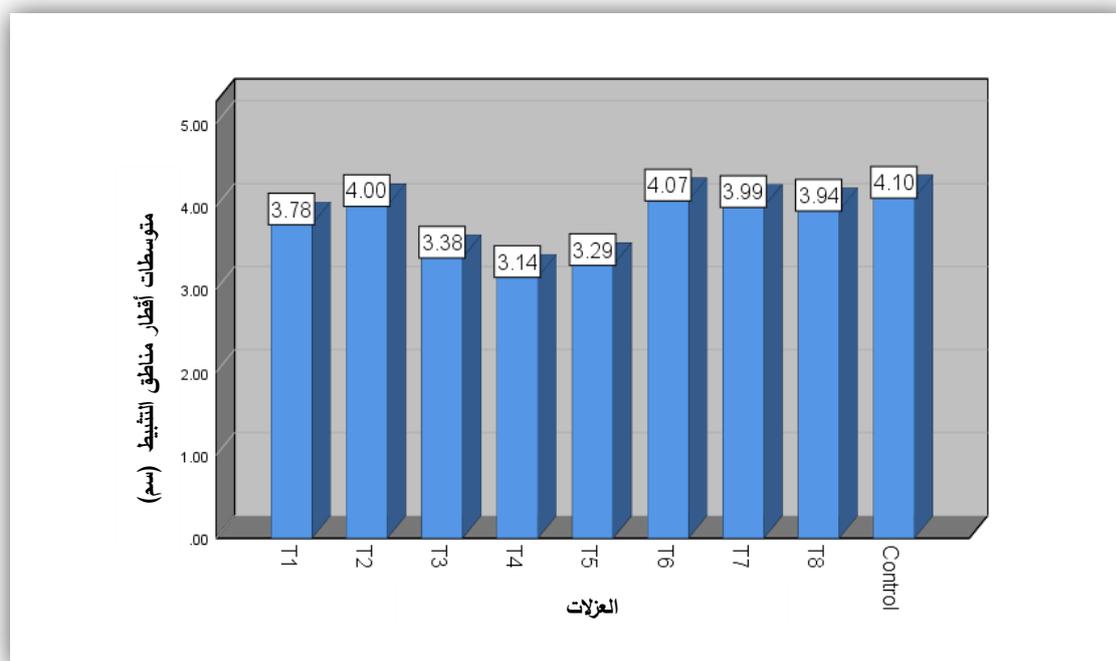


شكل (16.4) اختبار التضاد الحيوي للمركبات المتطايرة بطريقة الأطباق المقلوبة لعزلات فطر *Trichoderma* على فطر *Verticillium dahliae*. (A) طبق (الشاهد) وجود الفطر الممرض فقط. (B) طبق المعاملة الفطر التضاد مع الفطر الممرض.

جدول (11.4): متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *Verticillium dahliae* (سم)

P value	F test	نسبة التثبيط	الانحراف المعياري	±	المتوسط (سم)	العزلة
0.000	23.209**	%0.0	0.00	±	4.10 ^a	Control
		%7.8	0.23	±	3.78 ^b	<i>T. viride</i> (T1)
		%2.4	0.21	±	4.00 ^a	<i>T. koningiopsis</i> (T2)
		%17.6	0.10	±	3.38 ^c	<i>T. reesei</i> (T3)
		%23.4	0.05	±	3.14 ^d	<i>T. viride</i> (T4)
		%19.8	0.43	±	3.29 ^{cd}	<i>T. harzianum</i> (T5)
		%0.7	0.05	±	4.07 ^a	<i>Trichoderma</i> spp (T6)
		%2.7	0.03	±	3.99 ^a	<i>T. viride</i> (T7)
		%3.9	0.25	±	3.94 ^a	<i>T. aureoviride</i> (T8)

a, b, c, d الفروقات المعنوية بين العزلات، المشاركة في حرف واحد أو أكثر يعني عدم وجود فروقات معنوية.



شكل (17.4) متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Verticillium dahliae* (سم)

9.4 اختبار التضاد الحيوي للمركبات غير المتطايرة بطريقة غشاء السلوفان على الأوساط المغذية لعزلات فطر *Trichoderma* ضد فطر *V. dahliae*

1.9.4 تأثير الأوساط المغذية على فاعلية عزلات فطر *Trichoderma* في إنتاج المركبات غير المتطايرة لتثبيط نمو فطر *V. dahliae*

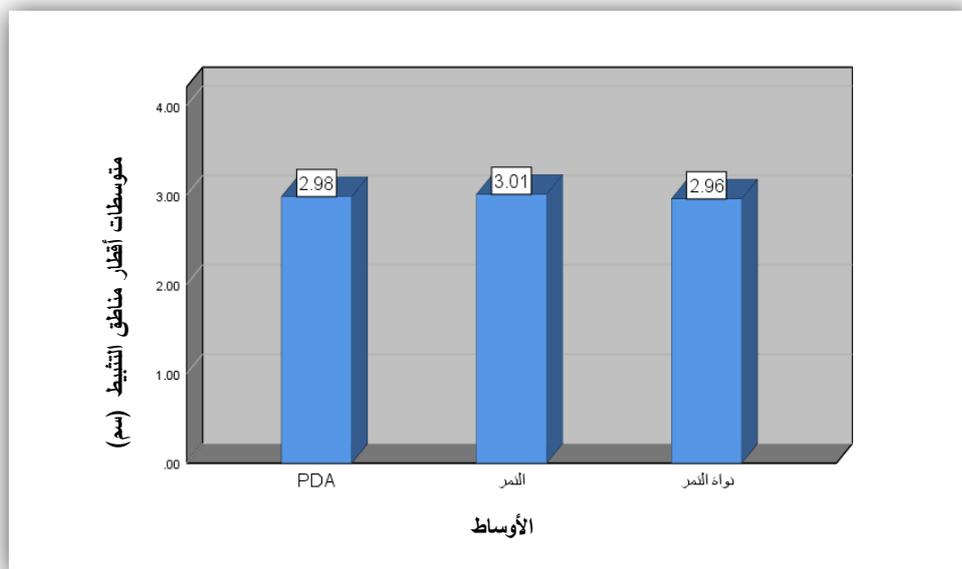
توضح النتائج تأثير الوسط في اختبار غشاء السلوفان للمركبات غير المتطايرة في الجدول (12.4) بين عزلات من فطر *Trichoderma* وعزله من فطر *V. dahliae* على أوساط مغذية مختلفة وسط اجار دكستروز البطاطس وسط التمر ووسط نواة التمر، كان التثبيط على هذه الأوساط لا توجد فروقات معنوية بينهم كان وسط نواة التمر بمتوسط 2.96 سم ويليه وسط اجار دكستروز البطاطس بمتوسط 2.98 سم ووسط التمر بمتوسط 3.01 سم

جدول (12.4): تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر

(سم) *Verticillium dahliae*

P-value	F test	الانحراف المعياري	±	المتوسط(سم)	الوسط
0.884	0.124	0.40	±	2.98 ^a	PDA
		0.39	±	3.01 ^a	التمر
		0.36	±	2.96 ^a	نواة التمر

a: لا توجد فروقات معنوية بين الأوساط.



شكل (18.4) تأثير الأوساط المغذية المختلفة على عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *Verticillium dahliae* (سم)

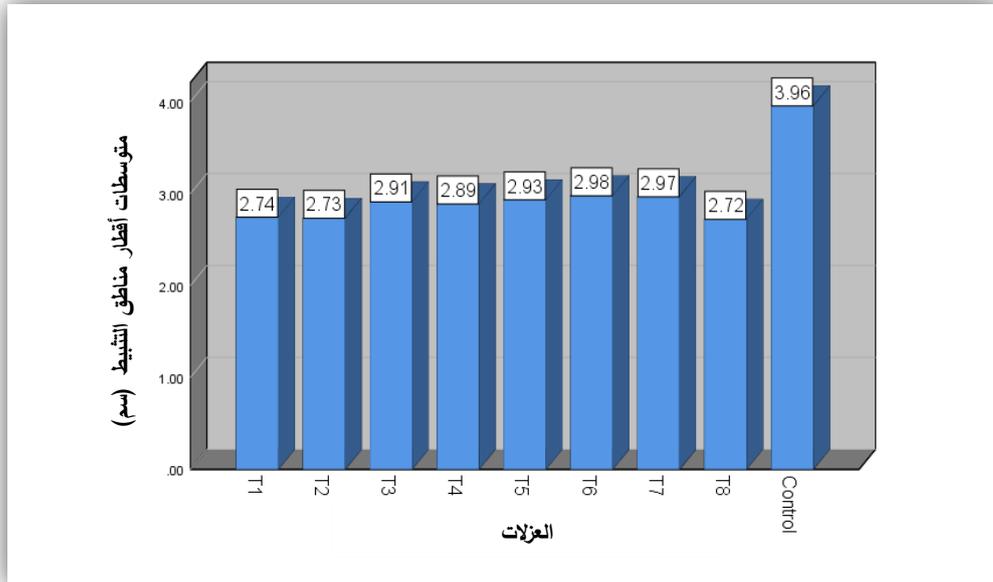
2.9.4 تأثير عزلات فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *V. dahliae*

أوضحت نتائج تأثير نوع العزلة في الجدول (13.4) في اختبار غشاء السلوفان للمركبات غير المتطايرة ان 8 عزلات لفطر *Trichoderma* لها القدرة على تثبيط فطر *V. dahliae* وكانت العزلات (T1) *T. viride*، *T. koningiopsis* و *T. aureoviride* هي أفضل العزلات في تثبيط الفطر الممرض ولا توجد فروقات معنوية بينهم ولكن توجد فروقات بينهم وبين العزلات الأخرى فكانت العزلة *T. aureoviride* بمتوسط 2.72 سم وبنسبه مئوية 31.3% مقارنة بالشاهد الذي كان بمتوسط 3.96 سم وبنسبة مئوية 0.0% ثم تليها العزلة *T. koningiopsis* بمتوسط 2.73 سم وبنسبه مئوية 31.1% مقارنة بالشاهد، ثم العزلة (T1) *T. viridie* بمتوسط 2.74 سم وبنسبة مئوية 30.8%، تتفق مع الدراسة التي قام بها Fotoohiyan وآخرون، (2017) أن المركبات غير المتطايرة التي تنتجها *T. harzianum* أظهرت تثبيط بنسبة 84.19% لفطر *V. dahliae* وتتوافق أيضا مع دراسة أخرى قام بها Benouzza وآخرون، (2020) أن المستقلبات غير المتطايرة التي تنتجها *T. atroviride* و *T. harzianum* أظهرت نسبة تثبيط 60.92% و 48.92% لفطر *V. dahliae*

جدول (13.4): متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Verticillium dahliae* (سم)

P-value	F test	نسبة التثبيط	الانحراف المعياري	±	المتوسط(سم)	العزلة
0.000	83.659**	0.0%	0.17	±	3.96 ^a	Control
		30.8%	0.11	±	2.74 ^b	<i>T. viridie</i> (T1)
		31.1%	0.08	±	2.73 ^b	<i>T. koningiopsis</i> (T2)
		26.5%	0.12	±	2.91 ^c	<i>T. reesei</i> (T3)
		27.0%	0.05	±	2.89 ^c	<i>T. viride</i> (T4)
		26.0%	0.04	±	2.93 ^c	<i>T. harzianum</i> (T5)
		24.7%	0.05	±	2.98 ^c	<i>Trichoderma</i> spp (T6)
		25.0%	0.22	±	2.97 ^c	<i>T. viride</i> (T7)
		31.3%	0.15	±	2.72 ^b	<i>T. aureoviride</i> (T8)

a, b, c، الفروقات المعنوية بين العزلات، المشاركة في حرف واحد أو أكثر يعني عدم وجود فروقات معنوية.

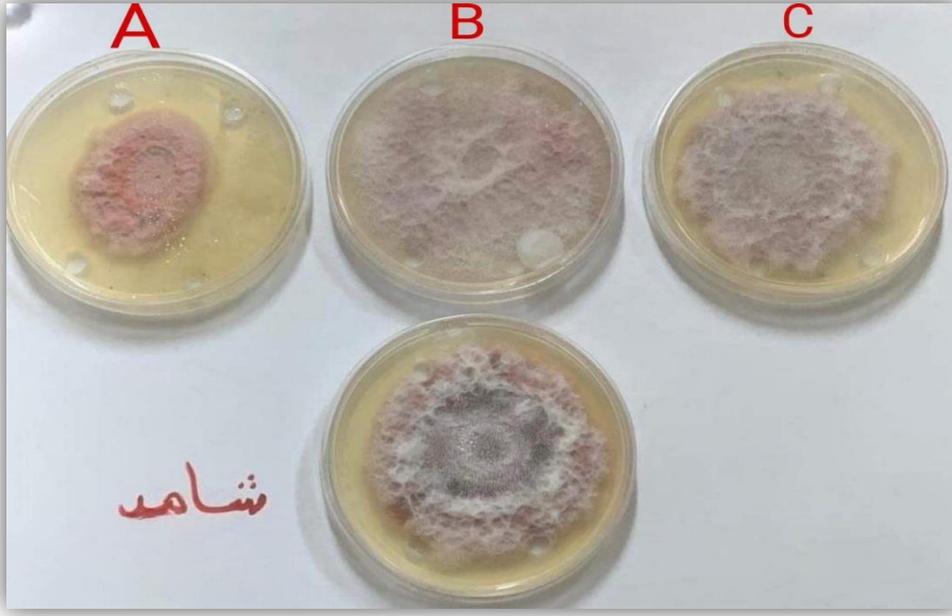


شكل (19.4) متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط نمو فطر *Verticillium dahliae* (سم)

أظهرت النتائج أن العزلة (*T. reesei* (T3) هي أفضل العزلات في جميع الاختبارات السابقة التي تم إجراؤها وبناء على ذلك استخدمت هذه العزلة في اختبار قدرتها على إنتاج المركبات المضادة للفطريات باستخدام الأوساط المغذية المختلفة المختبرة في هذه الدراسة، وتم استخلاص وتعريف مستقلباتها الأيضية باستخدام جهاز التحليل الكروماتوغرافي الغازي - مطياف الكتلة GC/MS.

10.4 تقييم النشاط المضاد للفطريات

أظهرت نتائج هذا الاختبار أن المستخلصات الحامضية فقط أظهرت فاعلية في نشاطها المضاد للفطريات، بينما المستخلصات القاعدية والمتعادلة لم تظهر أي نشاط مضاد في اختبار الانتشار في الوسط المغذي آجار دكستروز البطاطس مقارنة بالشاهد (مذيب ثنائي ميثيل سلفوكسيد)، كما مبين في الشكل (20.4) وعلى أساس هذا الاختبار تم تعريف المستخلصات للشق الحامضي فقط بواسطة جهاز GC / MS باستخدام أوساط مغذية مختلفة ومعرفة تأثير مكونات هذه الأوساط في إنتاج المضادات الفطرية.



شكل (20.4) تقييم النشاط المضاد لمستخلص التمر على فطر الفيوزاريوم بين الشقوق الثلاثة. (A) الحامضية

(B) المتعادلة (C) القاعدية مقارنة بالمذيب كشاهد

11.4 تعريف المركبات المضادة للفطريات باستخدام جهاز التحليل الكروماتوغرافي الغازي - مطياف

الكتلة GC/MS

1.11.4 مضادات الفطريات المتعرف عليها في وسط مرق دكستروز البطاطس لشق الحامضي

أوضحت النتائج كما مبين في الجدول (14.4)، أن النواتج الثانوية الموجودة في مستخلص

Trichoderma النامية في وسط مرق دكستروز البطاطس، احتوت على 21 مركبا عُرفت

بواسطة جهاز Gas chromatography mass spectrometry، كما بينت النتائج أن مركب

Phenylethyl Alcohol كانت نسبته 38.85% من المحتوى الكلي وصنف كمركب رئيسي والذي

أشارت الدراسات أن له خواص مضادة للفطريات، يليه المركب Dodecane والذي يعد من الأحماض

الدهنية ذات النشاط البيولوجي كانت نسبته 36.85% من المحتوى الكلي، هذا المركب سبق الإشارة

إلى دوره الفعال كمضاد ميكروبي جيد.

سجلت الدراسات السابقة أن بعض المركبات التي تم تعريفها في المستخلص المتحصل عليه من فطر التريكوثيرما في هذه الدراسة الحالية تمتلك نشاطاً حيويًا مضاداً للفطريات، كما مبين في الجدول (15.4) والتي أشارت العديد من الدراسات السابقة إلى فاعلية بعضها كمضادات للفطريات أو كعوامل مضادة للميكروبات، كما سجلت مشتقات benzyl mercaptan نشاط كمضاد ميكروبي ومضاد فطري من خلال الدراسة البحثية التي نشرت بواسطة (Azam و Suresh، 2012)، علاوة على ذلك، الدراسة التي قام بها Lens وآخرون، (2016) أن مركب (Butyl acetate) الذي تم إنتاجه بواسطة *T. asperellum* و *T. atroviride* له نشاط ضد الفطريات البيضية، من المركبات الأخرى للمضادات الفطرية الممرضة للنبات والانسان الذي تم تعريفه في هذا البحث هو مركب (Dodecane) كما أشار Niazi وآخرون، (2023)، وفي دراسة أخرى قام بها Pavirhra و Lalitha، (2020) أن له فاعلية ضد *F. oxysporum* وتم الحصول عليه من *T. harzianum* و *T. viride*، حيث سجل مركب (3,6-Dimethyldecane) أن له فاعلية ضد الفطريات الممرضة للنبات مثل *F. oxysporum* وله فاعلية أيضا ضد البكتيريا الممرضة للنبات كما في الدراسة التي قام بها (Kumari وآخرون، 2022)، وأشار الباحث (Amrati وآخرون، 2021) أن مركب Benzoic acid, 4- methyl-2-trimethylsilyloxy-, trimethylsilyl ester له نشاط حيوي ضد الفطريات وبكتيريا عدوى المستشفيات.

هناك بعض المركبات التي تم تعريفها في المستخلص لا توجد دراسات سابقة عنها حسب المعلومات المتاحة قد تكون ذات أهمية صناعية أو غيرها من المجالات.

الجدول (14.4) تعريف المركبات المضادة للفطريات لوسط مرق دكستروز البطاطس باستخدام جهاز التحليل الغازي

الكروماتوغرافي وبمساعدة مكتبة الأطياف GC- MS

المركب	الرقم	المركبات المفصولة	%	زمن الإحتجاز المرجعي	زمن الإحتجاز الفعلي	المركب
RI, MS, STD	1		0.43	939	937	α - Pinene
RI, MS, STD	2		1.08	805	804	Butyl acetate
RI, MS, STD	3		11.44	1066	1067	benzyl mercaptan
RI, MS, STD	4		0.87	2270	2271	Methyl N-hydroxybenzenecarboximidoate
RI, MS, STD	5		0.52	1014	1016	1,2,3-Trimethylbenzene
RI, MS, STD	6		0.53	988	989	psi.-Cumene
RI, MS, STD	7		0.36	1062	1061	4-Methyldecane
RI, MS, STD	8		1.19	1541	1540	1-(2-Methoxypropoxy)-2-propanol
RI, MS, STD	9		1.3	1005	1003	Benzyl alcohol
RI, MS, STD	10		0.73	1265	1266	Sulfide, sec-butyl cyclohexyl
RI, MS, STD	11		0.51	1680	1682	2,5-Dimethylbenzaldehyde
RI, MS, STD	12		0.91	1186	1189	α -Terpineol
RI, MS	13		36.85	1259	1260	Dodecane
RI, MS	14		0.98	1129	1130	3,6-Dimethyldecane
RI, MS	15		38.85	1906	1908	Phenylethyl Alcohol
RI, MS	16		0.46	1223	1223	Dimethyl hexanedioate
RI, MS, STD	17		1.01	1950	1952	Palmitic acid
RI, MS, STD	18		0.46	1784	1779	5-Ethyl-4-tridecanone
RI, MS	19		0.65	1591	1587	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate
RI, MS	20		0.31	2507	2505	Benzoic acid, 4-methyl-2-trimethylsilyloxy-, trimethylsilyl ester
RI, MS	21		0.56	1445	1448	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl ester

(RI) Retention indices : زمن الإحتجاز الفعلي

% : النسبة المئوية

جدول (15.4) المركبات المتحصل عليها من الوسط المغذي لمرق دكستروز البطاطس التي أشارت الدراسات إلى فعاليتها

المركب	المصدر (الكائن)	النشاط	المراجع
alpha-Pinene	<i>Trichoderma asperellum</i>	تأثيرات قوية مضادة للالتهابات (Antimicrobial)	Agbessenou وآخرون، 2022
		مضاد لفطر <i>Alternaria solani</i>	Abdelgaleil و Marei، 2017
Butyl acetate	<i>Trichoderma asperellum</i> و <i>Trichoderma atroviride</i>	ضد الفطريات البيضية (Antifungal)	Lens وآخرون، 2016
Methyl N-hydroxybenzenecarboximidoate	<i>Trichoderma triandra</i>	استخدامات الصيدلانية (Antimicrobial)	Das وآخرون، 2022
α -Terpineol	<i>Melaleuca alternifolia</i>	(ضد الفطريات) <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium italicum</i> و <i>P. digitatum</i>	Kong وآخرون، 2019
Dodecane	<i>Aspergillus clavatonanicus</i> و <i>Penicillium brasilianum</i>	ضد الفطريات الممرضة للنبات والانسان	Niazi وآخرون، 2023
	<i>Trichoderma harzianum</i> و <i>Trichoderma viride</i>	مضاد لفطر <i>F. oxysporum</i>	Lalitha و Pavirhra، 2020
3,6-Dimethyldecane	<i>Chaetomium globosum</i>	ضد الفطريات الممرضة للنبات تشمل <i>F. oxysporum</i> وكذلك البكتيريا الممرضة للنبات	Kumari وآخرون، 2022
Phenylethyl Alcohol	<i>Kloeckera apiculata</i>	نشاط واسع مضاد للفطريات الممرضة للنبات <i>Penicillium molds</i> و <i>Botrytis cinerea</i>	Zou وآخرون، 2022
Benzoic acid, 4-methyl-2-trimethylsilyloxy-, trimethylsilyl ester	<i>Caralluma europaea</i>	مضاد فطريات وبكتيريا عدوى المستشفيات	Amrati وآخرون، 2021
Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl ester	<i>Trichoderma spp.</i>	مضاد الفطر <i>Penicillium expansum</i>	Wang وآخرون، 2018؛ Bruisson وآخرون، 2023

2.11.4 مضادات الفطريات المتعرف عليها في وسط مستخلص التمر لشق الحامضي

بينت نتائج هذه الدراسة أن المستخلصات الأيضية لفطر التريكوثيرما النامي على الوسط

المغذي مستخلص التمر تواجد 28 مركب (16.4) وقد تم تسجيل (2- Hexanedioic acid, bis ethyl hexyl) ester كمركب رئيسي بنسبة 12.42% ثم يليه Hexadecanoic acid بنسبة 11.92%

من خلال الدراسات السابقة أثبت أن بعض المركبات الناتجة من فطر التريكوثيرما التي تم الحصول عليها من وسط التمر لها فاعلية كبيرة ضد الفطريات الممرضة للنبات وكذلك ضد البكتيريا كما مبين في الجدول (17.4)

حيث سجل مركب Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester النسبة العالية في المستخلص والذي أثبت أن له فاعلية ضد الفطر *Fusarium sp.* وله فاعلية ضد البكتيريا الممرضة للإنسان (Elleuch وآخرون، 2010)، بينما المركب Bis(2-ethylhexyl) phthalate، فقد بينا (Lalitha و Pavirhra، 2020) أن هذا المركب ينتجه فطر *T. harzianum* و *T. viride* وله الدور الفعال ضد *F. oxysporum*، من المركبات الأخرى المتحصل عليها في هذه الدراسة Hexadecanoic acid وهو مركب له نشاط مضاد لعدة مسببات أمراض نباتية كم تم الإشارة إليه في الدراسة التي قام بها (Kumar و Bhardwaj، 2017) أثبت أن هذا المركب ينتجه *Trichoderma asperellum*، وفي دراسة أخرى قام بها (Liu وآخرون، 2008) أن له فاعلية ضد *F. oxysporum* و *Alternaria solani*، وقد أشارت دراسات مماثلة أن *T. asperellum* ينتج العديد من مضادات الفطريات الأخرى كمركب cis-13-Octadecenoic acid الذي له نشاط ضد *F. xylarioides* كما في الدراسة التي قام بها (Mulatu وآخرون، 2022)، بينما في الدراسة قام بها (Liu وآخرون، 2008) أظهرت أن مركب Myristic acid

له فاعلية ضد فطر *F. oxysporum* وكذلك له نشاط ضد فطر *F. verticillioides* أما مركب β -Caryophyllene له تأثير مضاد *Alternaria solani* (Sobrinho وآخرون، 2020) وفي دراسة أخرى قام بها (Jassal وآخرون، 2021) أن له نشاط ضد *F. moniliforme*، وأشار الباحث (Zhao وآخرون، 2022) أن مركب Tetradecane الذي تم الحصول عليها من *Bacillus velezensis* له فاعلية ضد *V. dahliae*، وفي دراسة أخرى تشير أن نفس هذا المركب تم الحصول عليه من *T. harzianum* و *T. viride* وأثبت ان له نشاط ضد *F. oxysporum* (Lalitha و Pavirhra، 2020)، من ناحية أخرى قال الباحث Sekine وآخرون، (2007) أن مركب Cuminaldehyde المستخلص من (Black Zira) له فاعلية قوية ضد الفطريات الممرضة للنبات *F. oxysporum* و *V. dahliae*، كما أشار في نفس الدراسة على فاعلية p-Cymene ضد الفطريات المذكورة، كما أشار Brito وآخرون، (2019) أن مركب Isovaleraldehyde يلعب دور في تثبيط *F. verticillioides*، حيث سجل مركب Limonene المستخلص من زيت الحمضيات وله النشاط الفعال ضد *Fusarium graminearum* (Jian وآخرون، 2023)

وأشار الكثير من الباحثين إلى فاعلية بعض المركبات ضد أنواع أخرى من الفطريات والبكتيريا

كما موضح في الجدول (17.4)

الجدول (16.4) تعريف المركبات المضادة للفطريات لوسط مرق التمر باستخدام جهاز التحليل الغازي

الكروماتوغرافي وبمساعدة مكتبة الأطياف GC- MS

المركبات المفصولة	%	زمن الأحتجاز المرجعي	زمن الإحتجاز الفعلي	المركب	الرقم
RI, MS	2.53	1011	1004	3-Carene	1
RI, MS, STD	1.13	939	937	α - Pinene	2
RI, MS, STD	1.97	1267	1269	β -Terpinyl acetate	3
RI, MS	5.03	1015	1015	2-Ethyl-1-hexanol	4
RI, MS, STD	2.05	1122	1120	2-Phenyl ethanol	5
RI, MS	1.46	1113	1108	p-Cymene	6
RI, MS, STD	7.58	1032	1029	Limonene	7
RI, MS, STD	0.92	1291	1294	Decadienal	8
RI, MS, STD	8.48	1265	1259	Cinnamyl alcohol	9
RI, MS, STD	4.14	1022	1022	Succinic anhydride	10
RI, MS	3.82	646	641	Isovaleraldehyde	11
RI, MS, STD	1.19	1223	1229	Cuminaldehyde	12
RI, MS	0.81	1300	1299	Tridecane	13
RI, MS	1.22	1292	1288	2,4-Decadienal	14
RI, MS	6.89	1460	1462	Ethyl cinnamate	15
RI, MS	1.2	1400	1402	Tetradecane	16
RI, MS	3.76	1412	1407	β -Caryophyllene	17
RI, MS	1.36	1653	1648	Zingerone	18
RI, MS, STD	2.51	1723	1723	Myristic acid	19
RI, MS	0.98	1603	1959	Palmitic acid, methyl ester	20
RI, MS, STD	2.48	1950	1952	Palmitoleic acid	21
RI, MS, STD	11.92	1730	1734	Hexadecanoic acid	22
RI, MS	2.96	1835	1830	cis-13-Octadecenoic acid	23
RI, MS	12.42	2381	2383	Hexanedioic acid, bis (2-ethylhexyl) ester	24
RI, MS	1.93	2507	2505	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	25
RI, MS	5.72	1131	1129	Bisphenol, bis	26

المركب	الرقم	المركب	زمن الإحتجاز الفعلي	زمن الإحتجاز المرجعي	%	المركبات المفصولة
		(tert-butyl)dimethylsilyl ether				
Geranyl acetate	27		1770	1771	1.54	RI, MS
4-Chloro-N-[1-[2-(4-nitrophenyl)ethyl]-2-piperidinylidene]-benzenesulfonamide	28		2057	2057	2.53	RI, MS

(RI) Retention indices : زمن الإحتجاز الفعلي

% : النسبة المئوية

جدول (17.4) المركبات المتحصل عليها من الوسط المغذي التمر التي أشارت الدراسات إلى فعاليتها

المركب	المصدر (الكائن)	النشاط	المراجع
Geranyl acetate	<i>Thapsia minor</i>	مضاد للفطريات	Goncalves وآخرون، 2012
	<i>Dracocephalum moldavica</i>	مضاد للفطريات	Abbasi وآخرون، 2020
Bis(2-ethylhexyl) phthalate	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i>	مضاد لفطر <i>F. oxysporum</i>	Lalitha و Pavirhra، 2020
	<i>Xestospongia exigua</i>	مضاد للبكتيريا سالبة جرام	Kamaruding وآخرون، 2020
	<i>Chenopodium murale</i>	مضاد لفطر <i>F. oxysporum</i>	Naqvi وآخرون، 2019
	<i>Alhagi mannifera</i>	مضاد للفطريات والبكتيريا	Jaradat وآخرون، 2021
	<i>Adenophyllum porophyllum</i>	مضاد للفطريات <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> و <i>Pseudotheobromac</i>	Hernandez-Ceja وآخرون، 2021
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	مضاد للبكتيريا	Javed وآخرون، 2022
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	<i>Streptomyces spp.</i>	مضاد للفطريات مثل <i>Fusarium sp</i> أيضا ضد البكتيريا الممرضة للإنسان	Elleuch وآخرون، 2010
	<i>Bergenia ciliata</i>	مضاد للميكروبات، ومضاد للالتهابات، ومضاد للسرطان، ومبيد اليرقات	Ferdosi وآخرون، 2021
cis-13-Octadecenoic acid	<i>Trichoderma asperellum</i>	مضاد لفطر <i>Fusarium xyloarioides</i> ادوية السرطان ومبيدات الأعشاب ومبيدات الإفات	Mulatu وآخرون، 2022
Palmitic acid, methyl ester	<i>Annona muricata</i>	ضد الفطريات <i>A. solani</i> و <i>Aspergillus albicans</i>	Abubacker و Deepalakshmi، 2013
	<i>Chenopodium quinoa</i>	مضاد للفطريات وللبكتيريا ومضاد لسرطانات	Khan و Javaid، 2022

المراجع	النشاط	المصدر (الكائن)	المركب
2023، Shahidulla و Zeba	مضاد للفطريات	<i>Nigella sativa</i>	Hexadecanoic acid
2017، Kumar و Bhardwaj	مضاد ضد مسببات الامراض النباتية ومبيد للآفات	<i>Trichoderma Asperellum</i>	
2022، Johannes وآخرون،	<i>B. cinerea</i> <i>Rhizopus Stolonifer</i>	<i>Aglaophenia cupressina</i>	
2020، Chaidir وآخرون،	مضاد للبكتيريا	<i>Nannochloropsis oculata</i>	
2008، Liu وآخرون،	نشاط مضاد للفطريات <i>F. oxysporum</i> و <i>A. solani</i>		
2003، Kydonieus و Wille	Gram-positive bacteria		Palmitoleic acid
2021، Watanabe وآخرون،	<i>Staphylococcus aureus</i>		
2021، Javid وآخرون	نشاط مضاد ضد الفطريات والفيروسات والخلايا السرطانية	مستخلصات نباتية جوزة الطيب	Myristic acid
2008، Liu وآخرون،	نشاط مضاد للفطريات <i>A. solani</i> و <i>F. oxysporum</i>		
2022، Chochocca وآخرون،	<i>Moniliophthora roreri</i>	<i>Trichoderma spp.</i> <i>Zingiber officinale</i> <i>Aloe vera</i>	Zingerone
2016، Zhimo وآخرون،	ضد فطر <i>Colletotrichum musae</i>	<i>Zingiber officinale</i>	
2020، Sobrinho وآخرون،	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Trichophyton rubrum</i> و <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Vernonia chalybaea</i>	β-Caryophyllene
2021، Jassal وآخرون،	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>R. solani</i> and <i>Helminthosporium oryzae</i>	guava (<i>Psidium guajava</i>) leaves	
2020، Lalitha و Pavirhra	<i>F. oxysporum</i> مضاد لفطر	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i>	Tetradecane
2022، Zhao وآخرون،	<i>V. dahliae</i>	<i>Bacillus velezensis</i>	
2020، Marimuthu وآخرون،	مضاد لفطر <i>Pestalotiopsis theae</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	
2012، Kartal وآخرون،	<i>Trametes versicolor</i> <i>Aspergillus niger</i> و	<i>Liquidambar orientalis</i>	Ethyl cinnamate
2013، Golebiowski وآخرون،	Gram-positive bacteria <i>Candida species</i> و	Dipteran	2,4-Decadienal
2022، Reymick وآخرون،	<i>Penicillium digitatum</i>	/	Cuminaldehyde
2007، Sekine وآخرون،	مضاد لفطر <i>V. dahliae</i> و <i>F. oxysporum</i>	Black Zira	

المركب	المصدر (الكائن)	النشاط	المراجع
Isovaleraldehyde	حبوب الذرة	<i>F. verticilliodes</i>	Brito وآخرون، 2019
Cinnamyl alcohol	<i>Liquidambar orientalis</i>	<i>Trametes versicolor</i> and <i>Ceratocystis pilifera</i>	Kartai وآخرون، 2012
Limonene		<i>Fusarium graminearum</i>	Jian وآخرون، 2023.
		<i>Candida tropicalis</i>	Yu وآخرون، 2022
		<i>Trichophyton rubrum</i>	Chee وآخرون، 2009
p-Cymene	<i>Origanum acutidens</i>	مضاد ضد الفطريات	Kordali وآخرون، 2008
	<i>Trichoderma asperellum</i>	مبيد للحشرات ضد Anopheles	Podder و Ghosh، 2019
	<i>Trichoderma asperellum</i> <i>Trichoderma harzianum</i>	مضاد للميكروبات	Gualtieri وآخرون، 2022
	Black Zira	مضاد لفطر <i>F. oxysporum</i> و <i>V. dahliae</i>	Sekine وآخرون، 2007
2-Phenyl ethan	plants and microorganisms	<i>B. cinerea</i>	Zou وآخرون، 2022؛ Zhao وآخرون، 2022.
2-Ethyl-1-hexanol	بكتيريا المعزولة من Canola and Soybean Plant	مضاد لفطر <i>S. sclerotiorum</i>	Fernando وآخرون، 2005
	<i>Ralstonia sp</i>	<i>R. solani</i>	Wang وآخرون، 2021
β -Terpinyl acetate	Plant essential oils	<i>Penicillium italicum</i> و <i>P. digitatum</i>	Jing وآخرون، 2015
alpha-Pinene	<i>Trichoderma asperellum</i>	تأثيرات قوية مضادة للالتهابات	Agbessenou وآخرون، 2022.
3-Carene	نباتات	<i>Brochothrix thermosphacta</i> و <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Shu وآخرون، 2019

3.11.4 مضادات الفطريات المتعرف عليها في وسط مستخلص نواة التمر لشق الحامضي

أوضحت النتائج المسجلة في الجدول (18.4) أن مستخلص النواتج الأيضية لفطر *Trichoderma* النامي في وسط نواة التمر أحتوى على 18 مركباً، ومن بين هذه المركبات سُجل مركب Ethhyl propanoate كمركب رئيسي بنسبة 52.46% من اجمالي المحتوى ثم يليه مركب Butyl acetate بنسبة 37.6%، مع الإشارة إلى أن عدة مركبات التي تم تسجيلها في وسط نواة التمر كانت مشابهة للمركبات التي سبق تسجيلها في وسط مرق التمر منها α - Pinene، Limonene، و 4- Chloro- N- [1- [2-(4-nitrophenyl) ethyl]-2-piperidinyldene]-

benzenesulfonamide أما بالنسبة لوسط مرق دكستروز البطاطس فكان التشابه ببعض المركبات هي α - Pinene، Butyl acetate، α -Terpineol و Palmitic acid، ومع ذلك فإن الاختلاف بين المركبات كانت في السيادة والنسب المسجلة لكل مركب، أما الدور الذي تلعبه هذه المركبات فقد سبق الإشارة إليها عند استعراض المركبات المُعرفة في مستخلص النواتج الأيضية لفطر التريكوثيرما التي نمت على وسط مرق التمر ووسط مرق دكستروز البطاطس.

الجدير بالذكر أن المركبات التي لم يسبق الإشارة لها في الأوساط الأخرى السابقة مثل مركب 3-Octanone و Tricho-acorenol والتي استخلصت من وسط نواة التمر، قد وصفت من قبل Moya وآخرون، (2018) على أنها مركبات تم إنتاجها بواسطة نوعين من التريكوثيرما *T. longibrachiatum* و *T. harzianum* إلا أنه لا توجد إشارة لفاعلية هذه المركبات ضد مسببات الأمراض النباتية. ذكر Stoppacher وآخرون، (2010) أن مركب α - Terpinene المستخلص أيضا من وسط نواة التمر تم إنتاجه بواسطة *T. atroviride* وكذلك لا توجد إشارة لفاعلية هذا المركب ضد مسببات الأمراض، بعض المركبات التي تم تعريفها في المستخلص لا توجد دراسات سابقة تشير الي إنتاجها بواسطة فطر التريكوثيرما ولكن أشارت دراسات أخرى لإنتاج هذه المركبات من مستخلصات نباتة مثل مركب Geranial الذي له فاعلية كبيرة ضد الفطريات الجلدية كما في الدراسة التي قام بها (Park وآخرون، 2007)، من ناحية أخرى فقد نشر العالم Da Silva وآخرون، (2012)، بحثاً استعرض فيه دور مركبات Pinene، α - Pinene و β - Pinene كأحد المركبات عالية النشاط كمضادات بكتيرية وفطرية استخلصت من عدة مصادر نباتية، وكذلك مركب Hexamethylcyclotrisiloxane الذي تم الحصول عليه من مستخلصات نباتية له فاعلية ضد عدة أنواع من الاحياء الدقيقة الأخرى الممرضة للإنسان (Bautista-banos وآخرون، 2000) بعض المركبات المستخلصة من نواة التمر أكدت بعض الدراسات أنه تم الحصول عليها بواسطة كائنات

دقيقة اخرى مثل مركب 2-Phenyl ethanol الذي تم الحصول عليه من فطر *Candida quercitrusa* كما أكد (Lu وآخرون، 2023) أن له فاعلية في تثبيط *Phytophthora infestans* وكذلك مركب Ethyl propanoate الذي تم الحصول عليه من فطر *Candida stellimalicola* له نشاط عالي ضد *Penicillium digitatum* كما أشار الى ذلك Belinato وآخرون، (2018).

من خلال ما تقدم لوحظ أن اختلاف الأوساط المغذية كان له تأثير واضح على نوعية النواتج الايضية والتي من ضمنها المضادات الفطرية، وهذا يتوافق مع الدراسة التي قام بها Naher وآخرون (2012)، حيث أثبت أن تغير مصدر الكربون كان له تأثير على نوعية النواتج الايضية وتثبيط فطر *Ganoderma* وذلك عند استخدامه اجار سكرورز البطاطس مقارنة باستخدام آجار دكستروز البطاطس، كذلك في الدراسة التي قام بها Modrzewska وآخرون، (2022) أظهرت أن فطر *Trichoderma* عمل على تثبيط إنتاج السموم الفطرية بنسبة وصلت من 73 الى 98 % على وسط الأرز المغذي مقارنة باستخدام الوسط المغذي دكستروز آجار البطاطس.

الجدول (18.4) تعريف المركبات المضادة للفطريات لوسط مرق نواة التمر باستخدام جهاز التحليل الغازي

GC- MS الكروماتوغرافي وبمساعدة مكتبة الأطياف

المركبات المفصولة	%	زمن الإحتجاز المرجعي	زمن الإحتجاز الفعلي	المركب	الرقم
RI, MS, STD	0.28	939	937	α - Pinene	1
RI, MS, STD	37.6	805	804	Butyl acetate	2
RI, MS, STD	0.36	1541	1591	Hexamethylcyclotrisiloxane	3
RI, MS, STD	0.88	931	934	β - Pinene	4
RI, MS, STD	52.46	984	986	Ethyl propanoate	5
RI, MS, STD	0.88	1122	1120	2-Phenyl ethanol	6
RI, MS, STD	1.65	2270	2271	Methyl N-hydroxybenzenecarboximidoate	7
RI, MS, STD	0.78	1820	1822	Vanillin, tert-butyldimethylsilyl ether	8
RI, MS, STD	0.05	1014	1009	α - Terpinene	9
RI, MS, STD	0.51	1032	1029	Limonene	10
RI, MS, STD	0.78	970	967	3-Octanone	11
RI, MS	1.05	1186	1189	α -Terpineol	12
RI, MS	0.43	1578	1579	Bis[(trimethylsilyl)oxy]benzaldehyde	13
RI, MS	0.34	1246	1244	Geranial	14
RI, MS, STD	0.24	1673	1675	Tricho-acorenol	15
RI, MS, STD	0.51	1950	1952	Palmitic acid	16
RI, MS	1.08	2057	2057	4-Chloro-N-[1-[2-(4-nitrophenyl)ethyl]-2-piperidinylidene]-benzenesulfonamide	17
RI, MS	0.15	980	982	cis-9-Hexadecenoic acid, heptyl ester	18

(RI) Retention indices : زمن الإحتجاز الفعلي

% : النسبة المئوية

الخلاصة

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تعزيز المعرفة والفهم لدور الأوساط المغذية على إنتاج المستقلبات الايضية وتأثيرها على تثبيط الفطريات الممرضة للنبات. ركزت الاختبارات على مضادات الفطريات الطبيعية لفطر *Trichoderma* المعزولة من التربة وطرق استخلاصها وتطبيقات التعريف باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا، كان من المهم التركيز على دور الفطر المضاد ضد بعض مسببات الأمراض الفطرية المهمة، حيث قد تكون هذه المسببات ذات أهمية كبيرة لمكافحتها وذلك للخسائر الاقتصادية الكبيرة التي قد تسببها على أشجار الزيتون. وعلى هذا الأساس تم اختبار قدرة نشاط فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو فطر *Fusarium* وفطر *Verticillium* المسببان الرئيسيان لمرض الذبول على أشجار الزيتون. واحدة من الآليات الأساسية في المكافحة الحيوية لأمراض النبات هي إنتاج المستقلبات المضادة للفطريات، أجريت الاختبارات لعزل وتوصيف المستقلبات المضادة للفطريات التي ينتجها فطر *Trichoderma*.

نتائج البحث

- بناء على الاهداف الرئيسية المذكورة في المقدمة، تم التوصل إلى الاستنتاجات التالية:
1. تم استخدام الاختبار الحيوي المزدوج في المعمل بنجاح بناء على استخدام أوساط مزرعية باستخدام مستخلص التمر ونواة التمر وتأثيرهما على تثبيط الفطرين المختبرين مقارنة بالوسط المعروف آجار دكستروز البطاطس.
 2. تم اختيار أفضل 8 عزلات لفطر *Trichoderma* (من اصل 11 عزلة) على أساس قدرتها على تثبيط نمو الفطرين الممرضين *Fusarium* وفطر *Verticillium* باستخدام

الاختبار الحيوي المزدوج، كانت هذه الطريقة مناسبة وقابلة للتكرار ويُوصى بها لتحديد العزلات ذات الفاعلية في التثبيط.

3. بشكل عام، لم تظهر أي فروق ذات دلالة إحصائية للعزلات عند اختبارها على جميع الأوساط المغذية باستخدام الاختبار الحيوي المزدوج في المعمل، في الوقت الذي أظهر فيه نوع العزلة للفطر المضاد اختلافاً في قدرتها على التثبيط الفطري للمرضين.

4. تم عزل المستقلبات المضادة للفطريات من المواد الطافية للعزلات فطر *Trichoderma* العزلات والتي أظهرت فاعلية كبيرة في تثبيط الفطرين الممرضين. تم وصف هذه المستقلبات جزئياً باستخدام GC-MS.

5. أظهرت نتائج تعريف ووصف المستقلبات الأيضية تفاوت كبير من حيث نوعية ونسبة السيادة هذه النواتج باختلاف الوسط المغذي.

التوصيات

تم تطوير العديد من مبيدات الفطريات لمكافحة مرض الذبول في السنوات العديدة الماضية والتي تم اختبار قدرتها على مكافحة مسببات هذا المرض على أشجار الزيتون وغيرها من العوائل الأخرى. ومع ذلك، فإن صفة مقاومة مبيدات الفطريات في مجموعات مسببات الأمراض النباتية هي واحدة من أهم المشاكل في مجال إدارة الأمراض الكيميائية. في هذه الدراسة الأولية، استنتج أن بعض المستقلبات الايضية يمكن أن تكافح مسببات الذبول الوعائي. ربما يكون مستوى المكافحة الذي تم تحقيقه في هذه الدراسة مشابها لمستوى مبيد الفطريات الكيميائية المستخدمة في دراسات مختلفة لذلك، من المعقول أن نستنتج أن المضادات الفطرية بصورة فردية أو مجتمعة يمكن أن تحل محل، أو على الأقل تقلل، من استخدام مبيدات الفطريات الكيميائية في أنظمة مكافحة أمراض الذبول وربما غيرها من الأمراض النباتية الأخرى. علاوة على ذلك، يجب اختبار استخدام مزيج من المكافحة الكيميائية والبيولوجية للتأكد من فعاليتها ضد مسببات أمراض النبات مع الأخذ في الاعتبار تنوع هذه المستقلبات باختلاف الأوساط المغذية المستخدمة.

ينبغي إجراء المزيد من التجارب الحقلية للتأكد من فعالية هذه المستقلبات كعلاجات ضد مسببات أمراض الذبول على أشجار الزيتون، يمكن أيضاً اختبار العزلات لفطر *Trichoderma* المتحصل عليها في هذه الدراسة ضد مسببات الأمراض الشائعة الأخرى لتحديد طيف نشاطها.

كما يمكن اختبار أوساط مغذية أخرى تختلف في مصادر الكربون والنيتروجين وإمكانية اختبار بعض ما يتوقع أنها مستحثات لزيادة افراز فطر *Trichoderma* للمستقلبات المضادة للفطريات.

بعد الدراسة الأولية حول توصيف المستقلبات المضادة للفطريات، يجب إجراء دراسات أكثر تفصيلاً لتنقية التركيب الكيميائي للجزء النشط المسؤول على التثبيط وتوصيفه بالكامل.

المراجع

المراجع

- أبوعرقوب، محمد موسى (2000) المقاومة الحيوية لأمراض النبات، الطبعة الاولى، المكتبة الاكاديمية، القاهرة، 684 صفحة.
- البوني، عبد العزيز محمد (1990) أساسيات الفطريات العملي، جامعة طرابلس، ليبيا، شركة كولتز العلمية للنشر - ألمانيا، الطبعة: 1، 14، 61 صفحة.
- مرجان، علي فاضل والجنابي، جواد كاظم (2015). تشخيص عزلات الفطر *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* وتقييم امراضيتها تجاه الاصناف التفريقية لنبات الطماطمه. مجلة جامعة بابل، العلوم الصرفة والتطبيقية. 3(23)، 1250-1236.
- منظمة الأغذية والزراعة (2009). منظمة الأغذية والزراعة في ميدان العمل (إنتاج ما يكفي لإطعام تسعة مليارات نسمة) <https://www.fao.org/3/am023a/am023a.pdf>
- Abbasi, N., Fattahi M., Youbert I., Icon G. and Sefidkon F. (2020). Volatile Compounds and Antifungal Activity of *Dracocephalum moldavica* L. at different phenological stages. J. Essent. Oil Res. 34: 87-95.
- Abubacker, M. N. and Deepalakshmi, T. (2013). *In vitro* Antifungal Potentials of Bioactive Compound Methyl Ester of Hexadecanoic Acid Isolated from *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) Leaves biosciences biotechnology research Asia. 10(2), 879-884.
- Agbessenou, A., Akutse, K. S., Yusuf, A. A. and Khamis, F. M. (2022) The endophyte *Trichoderma asperellum* M2RT4 induces the systemic release of methyl salicylate and (Z)-jasmonone in tomato plant affecting host location and herbivory of *Tuta absoluta*. Front Plant Sci. 13.
- Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology (Plant diseases caused by fungi). 5th Ed. San Diego, Academic Press. 922 pp.

- Akrami, M., Golzary, H. and Ahmadzadeh, M. (2011). Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. *African. J. Biotechnol.* 10(14), 2653-2658.
- Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q. and Steinberg, C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist.* 184:529-544.
- Al-Ameri, H. A. and Rammadan, N. A. (2022). Biological control mechanisms of *Trichoderma* species to induce resistance in Leguminous plants. *International Journal of Advanced Multidisciplinary Research and Studies.* 2(3):144-150.
- Al-Jedabi, A. A. (2009). Biological control of *Fusarium* root-rot of sorghum. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences.* 5, 465-473.
- Altinok, H. H. (2009). *In vitro* production of fumonisin B1 and B2 by *Fusarium moniliforme* and the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Annals of Microbiology.* 59, 509-516.
- Amrati, F. E., Bourhia, M., Saghrouchni, H., Slighoua, M., Grafov, A., Ullah, R., Ezzeldin, E., Mostafa, G. A., Bari, A., Ibenmoussa, S., Bousta, D., Barros, L., Capasso, R. and Mannelli, L. D. C. (2021). *Caralluma europaea* (Guss.) N.E.Br.: Anti-Inflammatory, Antifungal, and Antibacterial Activities against Nosocomial Antibiotic-Resistant Microbes of Chemically Characterized Fractions. *Molecules.* 26(3), 636.
- Aneja, K. R. (2003). *Experiments in microbiology, plant pathology and biotechnology.* 4th Edition. New Age International Publishers, India.

- Arumugam, K., Ramalingam, P. and Appu, M. (2013). Isolation of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* organism from soil and their treatment against rice pathogens. 3(6), 77-81.
- Arunodhayam, K., Eswara, N. P., Reddy,6+ and Madhuri, V. (2014). Determination of the *in vitro* effect of *Trichoderma harzianum* on Phytopathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Current Biotica. 7, 343-358.
- Askew, D. J. and Laing, M. D. (1993). An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. Plant Pathol. 42, 686-690.
- Atehnkeng, J. P. S., Ojiambo, T., Ikotum, R. A., Sikora, P. J., Cotty and Bandyopadhyay, R. 2008. Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. Food Additives & Contaminants Part A., 25, 1266-1273.
- Awad, N. E., Kassem, H. A., Hamed, M. A., El-Feky, A. M., Elnaggar, M. A. A. and Mahmoud, K. (2018). Isolation and characterization of the bioactive metabolites from the soil derived fungus *Trichoderma viride*. Mycology 9, 70–80.
- Azam, M. A. and Suresh, B. (2012). Biological Activities of 2-Mercaptobenzothiazole Derivatives:A Review .Scientia Pharmaceutica. 80(4), 789-824.
- Bahatnagar, H. (1986). Influence of environmental condition on antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against *Fusarium udum*. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology. 26, 58-63.
- Barbara, D. J., and Clewes, E. (2003). Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? Molecular plant pathology. 4(4), 297-305.
- Bardin, M., Ajouz, S., Comby, M., Lopez-Ferber, M., Graillot, B., Siegwart, M. and Nicot, P. C. (2020). Is the efficacy of biological

- control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Frontiers in plant science*. 6, 1-14.
- Bautista-baños, S., Hernández-López, M. and Barrera-Necha, L.L. (2000). Antifungal screening of plants of the state of morelos, Mexico against four fungal postharvest pathogens of fruits and vegetables. *Journal of Natural Products*. 18, 36-41.
- Belinato, J. R. Kupper, K. C. and Augusto, F. (2018). *In vivo* investigation of the volatile metabolite of antiphytopathogenic yeast strains active against *Penicillium digitatum* using comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate data analysis. 141, 362-368.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. and Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*. 7, 249-260.
- Benouzza, S., Bellahcene, M. and Fortas, Z. (2020). Biocontrol of *Verticillium dahliae* by native *Trichoderma* strains isolated from Algeria. *Mycopath*. 18(2), 59-70.
- Bell, D. K., Wells H. D. and Markham C. R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal pathogens. *Phytopathology*. 72, 379-382.
- Berg, G., Marten, P., Minkwitz, A. and Bruckner, S. (2001) Efficient biological control of fungal plant diseases by *Streptomyces* sp. DSMZ 12424. *J. Plant Dis. Protect*. 108, 1-10.
- Bhardwaj, N. R. and Kumar, J. (2017). Characterization of volatile secondary metabolites from *Trichoderma asperellum*. *Journal of Applied and Natural Science*. 9(2), 954 – 959.
- Bogale, M. k., Wingfield, B. D., Wingfield. M. J. and Emma. T. (2006). Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from

- Ethiopia using AFLP, SSR and DNA sequence analyses. *Fungal Diversity*. 23, 51-66.
- Borowicz, J.J. and Omer, Z.S. (2000) Influence of rhizobacterial culture media on plant growth and on inhibition of fungal pathogens. *Biocontrol*. 45, 355-371.
- Brito, V. D., Achimon, F., Dambolena, J. S., Pizzolitto, R. P. and Zygadio, J. A. (2019). Trans-2-hexen-1-ol as a tool for the control of *Fusarium verticillioides* in stored maize grains. *Journal of stored products research*. 82, 123-130.
- Bruisson, S., Alfiky, A., Haridon, F. L. and Weisskopf, L. (2023) A new system to study directional volatile-mediated interactions reveals the ability of fungi to specifically react to other fungal volatiles *Frontiers in Ecology and Evolution* (IF 4.493).
- Cardoza, R-E., Hermosa, M-R., Vizcaíno, J-A., Luis Sanz, L., Monte, E. and Gutiérrez, S. (2005). Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. *Microorganism for industrial enzymes and biocontrol*. 1-22.
- Carrero-Carrón, I., Trapero-Casas, J. L., Olivares-García, C., Monte, E., Hermosa, R., and Jiménez-Díaz, R. M. (2016). *Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of *Verticillium* wilt in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Crop Prot.* 88, 45–52.
- Castro, D., Torres, M., Sampedro, Inmaculada., Martínez-Checa, F., Torres, B. and Bejar, V. (2020). Biological Control of *Verticillium* Wilt on Olive Trees by the Salt-Tolerant Strain *Bacillus velezensis* XT1. *Microorganisms*. 8(7), 1080.
- Chaidir, Z., Rahmi, S., Salim, M., Mardiah, E. and Pardi, H. (2020). Examination of the antibacterial and antifungal properties of fatty

- acids and fatty acid methyl ester obtained from *Nannochloropsis oculata* Rasayan. J. Chem. 13(2), 1134-1143.
- Chakraborty, M. R. and Chatterjee, N. C. (2008). Control of *Fusarium* wilt of *Solanum melongena* by *Trichoderma* spp. *Biologia plantarum*. 52(3), 582-586.
- Chee, H. Y., Kim, H. and Lee, M. H. (2009). *In vitro* Antifungal Activity of Limonene against *Trichophyton rubrum*. *Mycobiology*. 37(3), 243–246.
- Chet, I. and Inbar, J. (1994). Biological Control of Fungal Pathogens. *Appl Biochem Biotechnol*. 48, 37-43.
- Chococca, R. R. S., Avila, E. G., Rojas, J. H. F., Suazo, J. M. A., Cruz1, A. R. H. D. L. and Mohamed, M. M. H. (2022). Antifungal effect from *Zingiber officinale*, *Aloe vera* and *Trichoderma* sp. for control of *Moniliophthora roreri* in *Theobroma cacao* in Huánuco, Peru *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*. 75(1), 9823-9830.
- Conrado, R., Gomes, T. C., Roque, G. S. C. and De Souza, A. O. D. (2022). Overview of Bioactive Fungal Secondary Metabolites: Cytotoxic and Antimicrobial Compounds. *Antibiotics*. 11, 1-38.
- Cook, R. J. (1985). Biological Control of Plant Pathogens: theory to application. *Phytopathology*. 12, 75- 80.
- Cook, R.J. and Baker, K.F. (1983). The nature and practice of Biological Control of Plant Pathogens. St Paul, MN: American Psychopathological Society. 589 pp.
- Copping, L.G. (2001) The Biopesticide Manual. A World Compendium of Naturally Occuring Bripesticides-Hardcover. BCPC publications. 450pp.
- Collins, A., Okoli, C. A. N., Morton, A., Parry, D., Edwards, S. G. and Barbara, D. J. (2003). Isolates of *Verticillium dahliae* pathogenic

- to crucifers are of at least three distinct molecular types. *Phytopathology*. 93, 364-376.
- Correll, J. C., Gordon, T. R. and McCain, A. H. (1988). Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology*. 78(8),1017–1021
- Da Silva, A. C. R., Lopes, P. M., De Azevedo, M. M. B., Machado, D. C. C., Alviano, C. S. and Alviano, D. S. (2012). "Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers." *Molecules*. 17(6), 6305-6316.
- Daayf, F. (2015). *Verticillium* wilts in crop plants: Pathogen invasion and host defence responses. *Canadian journal of plant pathology*. 37(1), 8-20.
- Das, G., Gouda, S., Kerry, R.G., Cortes, H., Prado-Audelo, M. L. D., Leyva-Gomez, G., Fokou, P. V. T., Gutierrez-Grijalva, E. P., Heredia, J. B., Shin, H-S. and Patra, J.K. (2022). Review Article Study of Traditional Uses, Extraction Procedures, Phytochemical Constituents, and Pharmacological Properties of *Tiliacora triandra*. *Hindawi Journal of Chemistry* Volume 2022, Article ID 8754528. 16.
- De Souza, J. T., Weller, D. M. and Raaijmakers, J. M. (2003). Frequency, diversity, and activity of 2,4 diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in Dutch take-all decline soils. *Phytopathology*. 93, 54-63.
- De Capriles, C. H., Mata, S. and Middelveen, M. (1989). Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*. 106, 73-79.
- Deketelaere, S., Tyvaert, L., França, S.C. and Hofte, M. (2017). Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium wilt*. *Front. Microbiol.* 8, 1–23.

- Dendouga, W., Boureghda, H. and Belhamra, M. (2016). Biocontrol of Wheat *Fusarium* crown and root rot by *Trichoderma* spp. and evaluation of their cell wall degrading enzymes activities. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 51, 1-12.
- Dennis, C. and Webster, J. (1971a). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*, II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*. 57, 363-369.
- Dennis, C. and Webster, J. (1971b). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I, production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*. 57, 25-39.
- Dickie, G. A. and Bell, C. R. (1995). A full factorial analysis of nine factors influencing *in vitro* antagonistic screens for potential biocontrol agents. *Can.J. Microbiol.* 41, 284–293.
- Dubey, S. S., Suresh, M. and Singh, B. (2007). Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* for integrated management of chickpea wilt. *Biol. Control*. 40, 118-127.
- Duffy, B. K. and Défago, G. (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2429-2438.
- Elad, Y. (2000). Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection*. 19, 709-714.
- Elad, Y. and Chet, I. (1983). Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. *Phytoparasitica*. 11, 55–58.
- Elad, Y., Chet, I and Henis, Y. (1981). A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*. 9(1), 59-67

- Elleuch, L., Shaaban, M., Smaoui, S., Mellouli, L.m Karray-Rebai, I., Fourati-Ben Fguira, L., Shaaban, K.A. and Laatsch, H. (2010). Bioactive Secondary Metabolites from a New Terrestrial Streptomyces Sp. TN262. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 579–593.
- El-Tarabily, K. A., Soliman, M. H., Hassar, A. H., Al-Hassani, H. A., Sivasithamparam, K., McKenna, F. and Hardy, G. E. S. J. (2000). Biological control of *Sclerotinia* minor using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathol.* 49, 573-583.
- Es-Soufi, R. El Bouzdoudi, B. Bouras, M. El Kbiach, M. L. Badoc, A. Lamarti, A. (2017). Assessment of the Effect of Environmental Factors on the Antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma harzianum* to *Colletotrichum acutatum*. *Advances in Microbiology.* 7(11), 729.
- Faruk, M. I., Rahman, M. L. and Bari, M. A., (2002). Management of seedling disease of cabbage through *Trichoderma harzianum* amendment in seedbed. *Bangl. J. Plant Pathol.* 18, 49-53.
- Ferdosi1, M. F. H., Khan, I. H., Javaid, A., Saeed1, H. M., Butt, I. and Munir, A. (2021). GC-MS Analysis and Bioactive Components of Flowers of *Bergenia Ciliata*, A Weed of Rock Crevices in Pakistan. *Pakistan Journal of Weed Science Research.* 27(4), 527-535.
- Fernando, W. G. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A.S. and Savchuk, S.C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. 37, 955–964.
- Ferrigo, D., Raiola, A. and Causin, R. (2016). *Fusarium* Toxins in cereals: Occurrence, legislation, factors promoting the appearance and their Management. *Molecules.* 21, 627.

- Fisher, N. L., Burgess, L. W., Toussoun, T. A. and Nelson, P. E. (1982). Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*. 72, 151-153.
- Fotoohiyan, Z., Rezaee, S., Bonjar, G.H. S., Mohammadi, A.S. and Moradi, M. (2017). Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* in controlling wilt disease of pistachio caused by *Verticillium dahliae*. *Journal of Plant Protection Research*. 57(2), 185–193.
- Fradin, E. F. and Thomma, B. P. (2006). Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol. Plant Pathol.* 7, 71–86.
- Gajera, H., Domadiya, R., Patel, S., Kapopara, M. and Golakiya, B. (2013). Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system—A review. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* 1, 133–142.
- Georgakopoulos, D., Hendson, M., Panopoulos, N. J. and Schroth, M. N. (1994). Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression *in vitro* with the ice nucleation reporter gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2931-2938.
- Gerlach, W. and Nirenberg, H. (1982). The genus *Fusarium*-A pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land- und Forstwirtschaft (Berlin - Dahlem)* 209, 1-405.
- Gezgin, Y., Gul, D. M., Sensatar, S. S., Kara, C. U., Sargin, S., Sukan, F. V. and Eltem, R. (2020). Evaluation of *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma citrinoviride* growth profiles and their potentials as biocontrol agent and biofertilizer. *the journal Turkish Journal of Biochemistry*. 70(45), 14468-14479.

- Ghosh, S. K., Banerjee, S. and Sengupta, C. (2017). Bioassay, characterization and estimation of siderophores from some important antagonistic fungi. *J. Biopest.* 10(2), 105-112.
- Gohel, V., Maisuria, V. and Chhatpar, H. S. (2006). Utilization of various chitinous sources for production of mycolytic enzymes by *Pantoea dispersa* in bench-top fermentor. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1608-1614.
- Golezbiowski, M., Cerkowniak, M., Urbanek, A., Dawgul, M., Kamysz, W., Bogus, M. I., Sosnowska, D. and Stepnowski, P. (2013) Antimicrobial activity of untypical lipid compounds in the cuticular and internal lipids of four fly species. *Journal of Applied Microbiology.*
- Goncalves, M. J., Cruz, M. T., Tavares, A. C., Cavaleiro, C., Lopes M. C., Canhoto, J. and Salgueiro, L. (2012). Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. *Ind Crops Prod.* 35, 166–171.
- Gonzalez, M.F., Galarza L., Valdez L. L. and Quizhpe, G. M. (2023). Antifungal activity of metabolites from *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum*. *Bionatura Journal.* 8(2/7), 1-9.
- Grondona, I., Hermosa, R. and Tejada M. (1997). Physiological and Biochemical Characterization of *Trichoderma harzianum*, a Biological Control Agent against Soilborne Fungal Plant Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3189-3198.
- Gualtieri, L., Monti, M. M., Mele, F. and Russo, A. (2022). Volatile Organic Compound (VOC) Profiles of Different *Trichoderma* Species and Their Potential Application *J Fungi (Basel).* 8(10), 989.

- Guimarães, A. and Venâncio, A. (2022). The Potential of Fatty Acids and Their Derivatives as Antifungal Agents: A Review Toxins (Basel). 14(3), 188.
- Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., Santos-Villalobos, S. D. L., Parra-Cota, F. I., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Fadiji, A. F., Hyder, S. and Babalola, O. O. (2023). *Trichoderma* Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases-A Review. Plants. 12, 1-35.
- Haas, D. and Keel, C. (2003) Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 117-153.
- Hajieghrari, B., Torabi-Giglou, M., Mohammadi, M. R. and Davari, M. (2008). Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology.* 967-972.
- Hardwick, N. V., Jones, D. R. and Slough, J. E. (2001). Factors affecting diseases of winter wheat in England and Wales, 1989-98. *Plant Pathol.* 50, 453-462.
- Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perception derived from research on *Trichoderma harzianum* strain T-22. *Plant Disease Report.*84(4), 377-393.
- Harman, G. E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lori- to, M. (2004). *Trichoderma* species: opportunistic avir- ulant plant symbionts. *Nature rev. microbiol.* 2, 43-56.
- Hateet, R. R., Hassan, Z. A., Al-Mussawi, A. A., Banoon, S. R. (2021). Optimization of cultural conditions affecting improved bioactive metabolite production by endophytic fungus *Trichoderma harzianum*. *Bionatura.* 6(4), 2187-2192.

- Hernandez-Ceja, A., Loeza-Lara, P. D., Espinosa-Garcia, F. J., Garcia-Rodriguez, Y. M., Medina-Medrano, J. R. and Gutierrez-Hernandez, G. F. (2021). *In vitro* antifungal activity of plant extracts on pathogenic fungi of Blueberry (*Vaccinium* sp.). *Plants*, 10, 852
- Hillis, D. M. and Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic. *The Quarterly Review of Biology*. 66, 411-453.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases. The history and evolutions of current concepts. *Plant Disease*. 87(1), 4-10.
- Hrichi, S., Chaâbane-Banaoues, R., Alibrando, F., Altemimi, A. B., Babba, O., El Majdoub, Y. O., Nasri, H., Mondello, L., Babba, H., Mighri, Z. and Cacciola, F. (2022). Chemical Composition, Antifungal and Anti-Biofilm Activities of Volatile Fractions of *Convolvulus althaeoides* L. Roots from Tunisia. *Molecules*. 27(20), 1-14
- Hseu, R. S., Wang, H. H., Wang, H. F. and Moncalvo, J. M. (1996). Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNAPCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. *Applied Environmental Microbiology*. 62, 1354-1363.
- Inderbitzin P, Bostock RM, Davis RM, Usami T, Platt HW (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *Plos One*, San Francisco, California, US.
- Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., Ayed, F. and Mahjoub, M.L. (2009). Biological Control of Tomato *Verticillium* Wilt by

Using Indigenous *Trichoderma* spp. The African Journal of Plant Science and Biotechnology. 26-36.

Jaradat, N., Ghanim, M., Abualhasan, M., Rajab, A., Kojok, B., Abed, R., Mousa, A. and Arar, M. (2021). “Chemical compositions, antibacterial, antifungal and cytotoxic effects of Alhagi mannifera five extracts,” Journal of Complementary and Integrative Medicine. 19(4),869-877.

Jassal, k., Kaushal, S., Rashmi. and Rani, R. (2021). Antifungal potential of guava (*Psidium guajava*) leaves essential oil, major compounds: beta-caryophyllene and caryophyllene oxide. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 54, 19-20.

Javed, M. R., Salman, M., Tariq, A., Tawab, A., Zahoor, M.K., Naheed, S., Shahid, M., Ijaz. A. and Ali, H. (2022). The Antibacterial and Larvicidal Potential of Bis-(2-Ethylhexyl) Phthalate from *Lactiplantibacillus plantarum*. 1-15.

Javid, S., Purohit, M. N., Kumar, H. Y., Ramya, K., Mithuna, N. F. A., Salahuddin, M.D. and Kumar, B. R. P. (2021). Semisynthesis of Myristic Acid Derivatives and their Biological Activities: A Critical Insight. Journal of Biologically Active Products from Nature. 10(6), 455-472.

Jian, Y., Chen, X., Ma, H., Zhang, C., Luo, Y., Jiang, J. and Yin, Y. (2023). Limonene formulation exhibited potential application in the control of mycelial growth and deoxynivalenol production in *Fusarium graminearum* Front. Microbiol. 14, 1-11.

Jing, G., Tao, N-G., Jia, L. and Zhou, H-E. (2015). Influence of α -terpineol on the growth and morphogenesis of *Penicillium digitatum*. Bot Stud. 56(35), 1-6.

Johannes, E., Laga, A., Litaay, M., Husain, D. R., Haedar, N., Tuwo, M., Muru, J. H. and Pasandin, J. (2022). The Potentials of Isolated

- Hexadecanoic Acid of Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamoureux as an Antifungal Compound on the Rotten Strawberries *Fragaria x ananassa* Dutch. and Mango *Mangifera indica* L, International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology. 12(4), 1552-1557.
- Johnson, D. A., and Dung, J. K. (2010). *Verticillium* wilt of potato—the pathogen, disease and management. Canadian Journal of Plant Pathology. 32(1), 58-67.
- Kamaruding, N. A., Ismail, N. and Sokry, N (2020). Identification of Antibacterial Activity with Bioactive Compounds from Selected Marine Sponges. Pharmacogn J. 12(3), 493-502.
- Karapapa, V., Bainbridge, B., and Heale, J. (1997). Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. Mycol. Res. 101, 1281-1294.
- Kartal, S. N., Terzi, E., Yoshimura, T., Arango, R., Carol, A., Clausen, C. A. and Frederick Green, F. (2012). Preliminary evaluation of storax and its constituents: Fungal decay, mold and termite resistance. International Biodeterioration and Biodegradation. 70, 47-54.
- Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B. K., Singh, S. P. and Singh, H. B. (2014). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. Appl Microbiol Biotechnol. 98, 533–544.
- Keykhasaber, M., Thomma, B. P. H. J. and Hiemstra, J. A. (2018). *Verticillium* wilt caused by *Verticillium dahliae* in woody plants with emphasis on olive and shade trees. Eur. J. Plant Pathol. 150, 21–37.

- Khalid, I.Y. and Sahi, A. N. (2007). In vito biological control of *Fusarium oxysporum* causing wilt in *Capsicum annuum*. Pakistan. 5(2), 85-88.
- Khan, I. H. and Javaid, A. (2022). Hexane soluble bioactive components of leaf extract of quinoa. Journal of Animal & Plant Sciences, 32(2), 609-614.
- Khan, R. A., Najeeb, S., Hussain, S., Xie, B., and Li, Y. (2020). Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. Microorganisms. 8,817.
- Klosterman, S. J., Atallah, Z. K., Vallad, G. E. and Subbarao, K. V. (2009). Diversity, pathogenicity and management of *Verticillium* species. Annu. Rev. Phytopathol. 47, 39–62.
- Klotz, L. V., Nelson, P. E. and Toussoun, T. A. (1988). A medium for enhancement of chlamydospores formation in *Fusarium* species. Mycologia 80, 108-109.
- Knudsen, I. M. B., Hockenhull, J., Jensen, D. F., Gerhardson, B., Hokeberg, M., Tahvonen, R., Teperi, E., Sundheim, L. and Henriksen, B. (1997). Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. European Journal of Plant Pathology, 103, 775-784.
- Kohl, J., Kolnaar, R. and Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. Front Plant Sci. 10,845.
- Kong, Q., Zhang, L., An, P., Qi, J., Yu, X., Lu, J. and Ren, X. (2019). Antifungal mechanisms of α -terpineol and terpene-4-alcohol as the critical components of *Melaleuca alternifolia* oil in the inhibition of rot disease caused by *Aspergillus ochraceus* in postharvest grapes. Journal of Applied Microbiology, 126(4), 1161–1174.

- Kong, W-L., Ni, H., Wang, W-Y. and Wu, X-Q. (2022). Antifungal effects of volatile organic compounds produced by *Trichoderma koningiopsis* T2 against *Verticillium dahliae*. *Front. Microbio.* 1-13.
- Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R., Kesdek, M. and Mete, E. (2008). Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresour Technol.* 99(18), 8788-95.
- Korpi, A., Jarnberg, J. and Pasanen, A.L. (2009). Microbial volatile organic compounds; *Critical Reviews in Toxicology*, 39, 139–193.
- Koumoutsis, A. X. H., Chen, A., Henne, H., Liesegang, G., Hitzeroth, P., Franhe, J., Vater, and Borris, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloli* quefaciens strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186. 1084-1096.
- Krska, R., Welzig, E. and Boudr, H. (2007). Analysis of *Fusarium* toxins in feed. In: Morgavi, D.P., Riley, R.T. (Eds.), *Fusarium and their toxins: Mycology, occurrence, toxicity, control and economic impact.* *Anim. Feed Sci Technol.* 137, 241–264.
- Kubicek, C. P., Mach, R. L., Peterbauer, C. K. and Lorito, M. (2001). *Trichoderma*: from gene to biocontrol. *J Plant Pathol.* 83, 11–23.
- Kucuk, C. and Kivanc, M. (2004). *In vitro* antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. *Turkish Journal of Biology.* 28, 111-115.
- Kumar, M., Kumar, V., Rana, M. and Srivastava, S. (2019). Effect of Volatile and Non Volatile Compounds of *Trichoderma* spp. Against *Fusarium* Isolates Causing Chickpea Wilt in Punjab. *Plant Archives.* 19(1), 159-162.

- Kumari, S., Attri, C., Sharma, R., Kulshreshtha, S., Benali, T., Bouyahya, A., Güreer, E. S. and Hindawi, J. S-R. (2022). GC-MS Analysis, Antioxidant and Antifungal Studies of Different Extracts of *Chaetomium globosum* Isolated from *Urginea indica*. *BioMed Research International*.1- 12
- Kumeda, Y., Asao, T., Lida, A., Wada, S., Futami, S. and Fujita, T. (1994). Effects of ergokonin produced by *Trichoderma viride* on the growth and morphological development of fungi. *Bokin Bobai*. 22, 663-670.
- Kushwaha, M. and Verma, A. K. (2014). Antagonistic Activity of *Trichoderma* spp., (A Bio- Control Agent) Against Isolated and Identified Plant Pathogens. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences Research Paper*. 1(1), 1-6.
- Landa, B. B., Pérez, A. G., Luaces, P., Montes-Borrego, M., Navas-Cortés, J. A. and Sanz, C. (2019). Insights into the effect of *Verticillium dahliae* defoliating-pathotype infection on the content of phenolic and volatile compounds related to the sensory properties of virgin olive oil. *Front. Plant Sci*. 10, 1–12.
- Leelavathi, M.S., Vani, L. and Reena, P. (2014). Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(1), 96-103.
- Lens, C., Malet, G. and Cupferman, S. (2016). Antimicrobial activity of Butyl acetate, Ethyl acetate and Isopropyl alcohol on undesirable microorganisms in cosmetic products. *International journal of cosmetic science*. 38(5), 476-480.
- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. 1st ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, London.

- Li, X. L., Ojaghian, M. R., Zhang, J. Z. and Zhu, S. J. (2017). A new species of *Scopulariopsis* and its synergistic effect on pathogenicity of *Verticillium dahliae* on cotton plants. *Microbiological research*. 201, 12-20.
- Liu, S., Ruan, W., Jing Li, J., Xu, H., Jingan Wang, J., Gao, Y. and Wang, J. (2008). Biological Control of Phytopathogenic Fungi by Fatty Acids. *Mycopathologia*. 166, 93–102.
- Lo, C-T., Nelson, E. B. and Harman, G. E. (1996). Biological control of turfgrass diseases with a rhizosphere competent strain of *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*. 80, 736–741.
- López-Escudero, F. J. and Mercado-Blanco, J. (2011). *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant Soil*. 344, 1–50.
- Lu, J., Li, J., Li, L., Qi, L., Wang, Y., Yang, S., Xu, G., Dou, D., Lin, J. and Wang, X. (2023). Natural product 2-phenylethanol inhibits ATP synthesis of *p. infestans* by blocking the oxidative phosphorylation pathway to prevent potato late blight. *postharvest Biology and Technology*. 199.
- Mannai, S. and M’Hamdi, N. B. (2022). *In vitro* and in planta potential effect of some indigenous antagonists against *Fusarium* and *pythiaceous* species associated with peach seedlings decline. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 32 (60), 1-10.
- Marei, G. I. K., and Abdelgaleil, S. A. M. (2017). Antifungal Potential and Biochemical Effects of Monoterpenes and Phenylpropenes on Plant Pathogenic Fungi, *Plant Protect. Sci*. 54(1), 9–16.
- Marimuthu, S., Karthic, C., Mostafa, A. A., Nouf Mohammed Al Enazi, N. M. A. E., Abdel-Raouf, N. and Sholkamy, E. N. (2020). Antifungal activity of *Streptomyces* sp. SLR03 against tea fungal

- plant pathogen *Pestalotiopsis theae* Journal of King Saud University - Science. 32(8), 3258-3264.
- Metcalf, D. A. and Wilson, C. R. (2001). The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. Plant Pathol. 51, 249–257.
- Milner, J.L., Silo-Suh, L., Lee, J.C., He, H.Y., Clardy, J. and Handelsman, J. (1996). Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3061-3065.
- Modrzewska, M., Błaszczak, L., Stępień, L., Urbaniak, M., Waśkiewicz, A., Yoshinari, T. and Bryła, M. (2022). *Trichoderma* versus *Fusarium* Inhibition of Pathogen Growth and Mycotoxin Biosynthesis. Molecules. 27(23), 1-13.
- Monte, E., (2001). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. Int. Microb. 4, 1-4.
- Morokuma, K., Takahashi, K., Ishihara, J. and Hatakeyama, S. (2005). Total synthesis of viridiofungin A. The Royal of society of chemistry Uk.
- Moya, P., Girotti, J. R., Toledo, A.V. and Sisterna, M.N. (2018). Antifungal activity of *Trichoderma* VOCs against *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch. Journal of Plant Protection Research. 58(1), 45-53.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mukherjee, M. and Schmoll, M. (2013). *Trichoderma* in agriculture, industry and medicine: an overview. *Trichoderma* biology and applications. Boston: CAB International. 16, 1-9
- Mukhtar, T., Tariq-Khan, M. and Aslam, M. N. (2021). Bioefficacy of *Trichoderma* Species Against Javanese Root-Knot Nematode, *Meloidogyne javanica*, in Green Gram. Gesunde Pflanzen. 73(3), 265-272.

- Mulatu, A., Megersa, N., Tolcha, T., Alemu, T. and Vetukuri, R. R. (2022). Antifungal compounds, GC-MS analysis and toxicity assessment of methanolic extracts of *Trichoderma* species in an animal model, PLoS One. 17(9), 1-16.
- Naher, L., Yusuf, U. K., Siddiquee, S., Ferdous, J. and Rahman, M. A. (2012). Effect of media on growth and antagonistic activity of selected *Trichoderma* strains against Ganoderma. African Journal of Microbiology Research. 6(48), 7449-7453.
- Nawade, B., Talaviya, J. R., Vyas, U. M., Jadeja, K. B. and Diversity, B. A. (2017). Analysis among *Fusarium oxysporum* F. Sp. cumini Isolates Using ISSR Markers, Spore Morphology and Pathogenicity. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.6(4), 79-87.
- Naqvi, S. F., Javaid, A. and Qureshi, M. Z. (2019). Evaluation of antifungal potential of leaf extract of *Chenopodium murale* against *F. oxysporum* f. sp. lycopersici. Planta Daninha.37, 139.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. (1983a). *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. (1983b). *Fusarium* Species. In: An Illustrated Manual for Identification, Pennsylvania State University Press, University Park. 193.
- Niazi, S. K., Basavarajappa, D. S., Kumaraswamy, H. H., Bepari, A., Hiremath, H., Nagaraja, S. K., Rudrappa, M., Hugar, A., Cordero, M. A. W. and Nayaka, S. (2023). GC-MS Based Characterization, Antibacterial, Antifungal and Anti-Oncogenic Activity of Ethyl Acetate Extract of *Aspergillus niger* Strain AK-6 Isolated from Rhizospheric Soil. *CIMB*. 45(5), 3733-3756.

- Nikam, P. S., Jagtap, G. P. and Sontakke, P. L. (2007). Management of chickpea wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. African Journal of Agricultural Research India, Vol. 2 (12), 692-697.
- Ownley, B.H., Weller, D.M. and Thomashow, L.S. (1992) Influence of in situ and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Phytopathology. 82, 178-184.
- Pandya, J. R., Sabalpara, A. N. and Chawda, S. K. (2011). Trichoderma: A particular weapon for biological control of phytopathogens. J. Agric. Technol. 7, 1187-1191.
- Parang, K ., Knaus, E. E., Wiebe, L. I., Sardari, S., Daneshtalab, M. and Csizmadia, F. (1996). Synthesis and antifungal activities of myristic acid analogs. Arch Pharm (Weinheim). 329(11), 475-82.
- Park, M-J., Gwak, K-S., Yang, I., Won-Sil Choi, W-S., Jo, H-J., Chang, J-W., Jeung, E-B. and Choi, I-G. (2007). Antifungal Activities of the Essential Oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their Constituents against Various Dermatophytes. Journal of Microbiology. 45(5), 460-465.
- Parry, D.W. (1990) The incidence of *Fusarium* spp. in stem bases of selected crops of winter wheat in the Midlands, UK. Plant pathol. 39, 619-622.
- Patra, S. and Biswas, M. K. (2017). Studies On Cultural, Morphological and Pathogenic Variability Among the Isolates of *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Ciceri* Causing Wilt of Chickpea. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences. 7(1), 11-16.
- Pavirhra, R. and Lalitha, S. (2020). Tetradecane producing biocontrol agent, *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* in tomato

- (*Solanum lycopersicum* L.). International Journal of Agricultural Technology. 16(6), 1475-1492.
- Pegg, G. F. and Brady, B. L. (2002). *Verticillium* Wilts. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Perelló, A. M., Conaco, C., Simón, M. R., Sisterna, M. and Bello, G. D. (2003). Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. Crop Prot. 22, 1099–1106.
- Persoon, C. H. (1794). Neuer Versuch einer systematischen Einteilung der Schwämme. Racodium Römer's Neues Magazin der Botanik. 1, 123.
- Pettitt, T. R. and Parry, D. W. (1993). Improved estimation of the incidence of *Microdochium nivale* in winter wheat stems in England and Wales, during 1992, by use of benomyl agar. Mycological Research. 97(10), 1172-1174.
- Podder, D. and Ghosh, S. K. (2019). A new application of *Trichoderma asperellum* as an anopheline larvicide for eco-friendly management in medical science. Sci Rep. 9(1), 1108.
- Prange, A., Birzele, B., Krämer, J., Meier, A., Modrow, H. and Köhler, P. (2005). *Fusarium*-inoculated wheat: Deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time. Food Control. 16(8), 739-45.
- Prasath, K. G., Alexpandi, R., Parasuraman, R., Pavithra, M. (2021) Anti-inflammatory potential of myristic acid and palmitic acid synergism against systemic candidiasis in *Danio rerio* (Zebrafish) Biomedicine and Pharmacotherapy. 133, 111043.
- Pritsch, C., Muehlbauer, G. J., Bushnell, W. R., Somers, D. A. and Vance, C. P. (2000). Fungal Development and Induction of Defense Response Genes During Early Infection of Wheat Spikes

- by *Fusarium graminearum*. Molecular plant-Microbe Interactions. (13)2, 159-169.
- Raaijmakers, J. M., Vlami, M. and de Souza, J. T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie van Leeuwenhoek. 81, 537-547.
- Reymick, O. O., Liu, D., Cheng, Y. and Ouyang, Q. (2022). Nengguo Tao Cuminaldehyde-induced, oxidative stress inhibits growth of *Penicillium digitatum* in citrus. Postharvest Biology and Technology. 192, 111991
- Rowe, R. C., Riedel, R. M. and Martin, M. J. (1985). Synergistic interactions between *Verticillium dahliae* and *Pratylenchus penetrans* in potato early dying disease. Phytopathology. 75(4), 412-418.
- Ruggieri, G. A. (1946). new disease of olive. L'Italia Agric. 83, 369–372.
- Ryall, A. L. and Lipton, W. J. (1972). Handling, Transportation, and Storage of Fruits and Vegetables. Volume I, Vegetables and Melons. The AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, 473 p.
- Saleh, R. M., Kabli, S. A., Al-Garni, S. M and Mohamed, S. A. (2011). Screening and production of antibacterial compound from *Trichoderma* spp. against human-pathogenic bacteria. African Journal of Microbiology Research Vol. 5(13), 1619-1628.
- Salleh, B. and Sulaiman, B. (1984). Fusaria associated with naturally diseased plants in Penang. Journal of Plant Protection in the Tropics. 1, 47-53.
- Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycol Res. 100, 923-935.
- Sathiyabama, M. and Parthasarathy, R. (2016) Biological preparation of chitosan nanoparticles and its *in vitro* antifungal efficacy against

- some phytopathogenic fungi. *Carbohydrate Polymers*. 151, 321-325.
- Schnurer, J., Olsson, J. and Borjesson, T. (1999). Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage. *Fungal Genetics and Biology*. 27, 209–217.
- Schuster, A. and Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(3), 787–799.
- Sekine, T., Sugano, M., Majid, A. and Fujii, Y. (2007). Antifungal Effects of Volatile Compounds from Black Zira (*Bunium persicum*) and Other Spices and Herbs. *Journal of chemical ecology*. 33, 2123–2132
- Shah, P., Abid1, M., Abbas, A., Basheer, N., Sheikh, A. H., Jabeen, N. and Sitara, U. (2020). Screening of *Trichoderma viride* as a Bio-Control Agent Against Different Soil-Borne Infectious and Phytopathogenic Fungi. *International Journal of Biology and Biotechnology*. 17(2), 405-410.
- Shanahan, P., O’Sullivan D. J., Simpson, P., Glennon, J. D. and O’Gara, F. (1992). Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 353-358.
- Shirani, M., Samimi, A., Kalantari, H., Madani, M. and Zanganeh, K. A. (2017). Chemical composition and antifungal effect of hydroalcoholic extract of *Allium tripedale* (Tvautv.) against *Candida* species *Curr Med Mycol*. 3(1), 6–12.
- Shu, H., Chen, H., Wang, X., Hu, Y., Yun, Y., Zhong, Q., Chen, W. and Chen, W. (2019). Antimicrobial Activity and Proposed Action

Mechanism of 3-Carene against *Brochothrix thermosphacta* and *Pseudomonas fluorescens*. 1-18.

Sharma, K. K. and Singh, U. S. (2014). Cultural and morphological characterization of rhizospheric isolates of fungal antagonist *Trichoderma*. *Journal of Appl and Natur Science*. 6(2), 451-456.

Singh, H. B., Singh, B. N., Singh, S. P., Singh, S. R. and Sarma, B. K. (2009). Biological control of plant diseases: current status and future prospects. In: Johri, J.K. (Ed.), *Recent Advances in Biopesticides: Biotechnological Applications*. New India Pub, New Delhi. 322.P.

Singh, S. K., Singh, P. N., Maurya, D. K. and Shiwali, R. (2021). Advances in Systematics, Taxonomy, and Conservation of *Trichoderma* Species. *Trichoderma: Agricultural Applications and Beyond*. 1–20.

Sobowale, A. A., Uzoma, L. C., Aduramigba-Modupe, A. O. and Bamkefa, B. A. (2022). Fungitoxicity of *Trichoderma longibrachiatum* (Rifai) Metabolites against *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus tamarii*. *American Journal of Plant Sciences*. 13(7), 984-993.

Sobrinho, A. C. N., De Moraes, S. M., De Souza, E. B., Albuquerque, M. R. J. R., Dos Santos, H. S., Cavalcante, C. S. D-P., De Sousa, H. A. and Fontenelle, R. O. D-S. (2020). Antifungal and Antioxidant Activities of *Vernonia Chalybaea* Mart. ex DC. Essential Oil and their Major Constituent β -caryophyllene. *Brazilian Archives of Biology and Technology* . 63. 1-11.

Song, Y. and Thomma, B. P. (2018). Host-induced gene silencing compromises *Verticillium* wilt in tomato and Arabidopsis. *Molecular plant pathology*. 19(1), 77-89.

- SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). (2017). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY:IBM Corp.
- Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R. and Schuhmacher, R. (2010). Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GCMS. *Journal of Microbiological Methods*. 81(2), 187–193.
- Stracquadiano, C., Quiles, J. M., Meca, G. and Cacciola, S. O. (2020). Antifungal Activity of Bioactive Metabolites Produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in Liquid Medium. *J Fungi (Basel)*. 6(4), 263.
- Thomashow, L.S. and Weller, D.M. (1995) Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: *Plant-Microbe Interactions*, Stacey, G. and Keen, N. (eds.), Chapman and Hall, New York. 1, 187-235.
- Thomashow, L.S., Bonsall, R.F. and Weller, D.M. (1997). Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. In: *Manual of Environmental Microbiology*, Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D. and Walter M.V. (eds.), ASM Press, Washington, DC. 493-499.
- Trabelsi, R., Sellami, H., Gharbi, Y., Krid, S., Cheffi, M., Kammoun, S., Dammak, M., Mseddi, A., Gdoura, R. and Triki, M. A. (2017). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with olive trees dieback in Tunisia. 7(28), 2-9.
- Tran, N. H. (2010). Using *Trichoderma* species for biological control of plant pathogens in Vietnam. *Journal of ISSAAS*. 16, 17-21.
- Tripathi, P., Singh, P. C., Mishra, A., Puneet, S., Chauhan, Dwivedi, S., Thakur, R., Deo, B. and Tripathi, R. (2013). *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental cleanup. *Clean Technol. Environ. Policy*. 15, 541-550.

- Tyskiewicz, 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. *Int. J. Mol. Sci.* 23(4): 23-29.
- Vance1, C. P. (2000). Fungal Development and Induction of Defense Response Genes During Early Infection of Wheat Spikes by *Fusarium graminearum*. (13) 2, 159-169.
- Velásquez, A.C., Castroverde, C.D.M. and He, S.Y. (2018). Plant-Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. *Curr. Biol.* 28, 619–R634.
- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y. and Valero, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control *Biochem. Eng. J.* 30, 1-20.
- Vinale, F., Marra, R. and Ruocco, M. (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol. J.* 8, 127–139.
- Vincent, J. M. (1947). Distortion of Fungal hyphae in the presence of certain inhibitors. *Nature.* 150(4251), 850.
- Wang Y, Feng K, Yang H, Yuan, Y. and Yue, T. (2018). Antifungal mechanism of cinnamaldehyde and citral combination against: *Penicillium expansum* based on FT-IR fingerprint, plasma membrane, oxidative stress and volatile profile. *RSC Advances.* 8(11), 5806–5815.
- Wang, E., Liu, X., Si, Z., Li, X., Bi, J., Dong, W., Chen, M., Wang, S., Zhang, J., Song, A. and Fan, F. (2021). Volatile Organic Compounds from Rice Rhizosphere Bacteria Inhibit Growth of the Pathogen *Rhizoctonia solani*. *Agriculture.* 11(4), 368.
- Watanabe, T., Yano, S., Kawai, T., Jinbo, Y. and Nonomura, Y. (2021). Selective Antibacterial Activity of Palmitoleic Acid in Emulsions

- and Other Formulations Journal of Surfactants and Detergents. 24(7), 973-979.
- Watts, R., Dahiya, J. and Chaudhary, K. (1988). Isolation and Characterization of a New Antifungal Metabolite of *Trichoderma reesei*. Plant and Soil. 107, 81-84.
- Wei, S. and Jie, C. (2020). Screening of antagonistic *Trichoderma* strains and their application for controlling stalk rot in maize. Journal of Integrative Agriculture. 19(1), 145–152.
- Weindling, R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. as a parasite of other soil fungi. Phytopathology. 22(10), 837-845.
- Weller, D. M. (1988). Biological control of soil-borne pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. 6, 379-407.
- Wille, J. J. and Kydonieus, A. (2003). Palmitoleic Acid Isomer (C16:1Δ6) in Human Skin Sebum Is Effective against Gram-Positive Bacteria Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology. 16 (3), 176–187.
- Woloshuk, C. P. and Shim, W. B. (2013). Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. FEMS Microbiology Reviews. 37(1), 94–109.
- Yaqub, F. and Shahzad, S. (2008). Effect of seed pelleting with *Trichoderma* spp., and *Gliocladium virens* on growth and mugbean by colonization of roots of sunflower *Sclerotium rolfsii*. Pakistan Journal of Botany. 40(2), 947-963.
- Yassin, M. T., Mostafa A. A. and Al-Askar A. A. (2022). *In vitro* antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against fungal pathogens causing black point disease of wheat. Journal of Taibah University for Science. 16, (1) 57-65.
- Yu, H., Lin, Z-X., Xiang, W-L., Huang, M., Tang, J., Lu, Y., Zhao, Q-H., Zhang, Q., Rao, Y. and Liu, L. (2022). Antifungal activity and

- mechanism of d limonene against foodborne opportunistic pathogen *Candida tropicalis*. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*. 159, 113-144.
- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q. and Huang, Q. (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(16), 5242–5944.
- Yuan, W. M. and Crawford, D. L. (1995) Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(8), 3119-3128.
- Zeba, F. and Shahidulla, S. M. (2023). Formulation, optimization and evaluation of hexadecanoic acid phytosomal gel for anti-fungal activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 14(1), 519-529.
- Zhang, J., Tang, W., Huang, Q., Li, Y., Wei, M., Jiang, L., Liu, C., Yu, X. and Zhu, H. (2022). *Trichoderma*: A treasure house of structurally diverse secondary metabolites with medicinal importance. *Frontiers in Microbiology*. 12, 2037.
- Zhao, X., Zhou, J., Tian, R. and Liu, Y. (2022). Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges *Frontiers in Microbiology*. 13, 922450.
- Zhimo, Y., Kole, R. and Saha, J. (2016). Antifungal activity of plant extracts against *Colletotrichum musae*, the post harvest anthracnose pathogen of banana cv. Martaman. *Nutrition and food Science*. 46(1), 2-15.
- Zhi-xiang, L., Guang-ping, T., Ting, Z., Ya-qian, L., Xin-hua, W., Quan-guo, Z., Wei, S. and Jie, C. (2020). Screening of antagonistic *Trichoderma* strains and their application for controlling stalk rot in maize. *Journal of Integrative Agriculture*. 19(1), 145–152.

Zou, X., Wei, Y., Jiang, S., Xu, F., Wang, H., Zhan, P. and Shao, X. (2022). ROS Stress and Cell Membrane Disruption are the Main Antifungal Mechanisms of 2-Phenylethanol against *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 70(45), 14468-14479.

الملاحق

الأوساط المغذية

ملحق (1) الوسط المغذي الانتقائي لتريكوديرما

مكونات الوسط المغذي

0.2 جرام / لتر	كبريتات الماغنيسيوم المائية
0.9 جرام / لتر	ثنائي فوسفات البوتاسيوم
1 جرام / لتر	نترات الامونيا
1 جرام / لتر	كلوريد البوتاسيوم
3.0 جرام / لتر	جلوكوز
0.25 جرام / لتر	الكلورامفينيكول
0.15 جرام / لتر	البنغال الوردي
20 جرام / لتر	آجار
1000 مل	ماء

تم خلط المكونات وإذابتها في 950 مل من الماء المقطر وعقمت في الاتوكليف عند درجة حرارة 121م لمدة 30 دقيقة، تم إضافة الكلورامفينيكول الى 50 مل من الماء المقطر المعقم ويضاف الى الوسط عند درجة حرارة 40- 50م

ملحق (2) الوسط المغذي آجار دكستروز البطاطس

42 جرام / لتر	آجار دكستروز البطاطس
1000 مل	ماء

ملحق (3) الوسط المغذي لتمر

200 جرام / لتر	التمر
20 جرام / لتر	آجار
1000 مل	ماء

يتكون الوسط من 200جم من التمر بدون نواه وأضيف الى 500مل من الماء المقطر ووضعت في حمام مائي عند درجة حرارة 80م لمدة 30 دقيقة، رشح باستخدام الشاش الطبي على الجانب الآخر تم إذابة 20جم من الآجار في 500مل من الماء المقطر المعقم وتم خلط المكونات وعدل تركيز ايون الهيدروجين عند 6.8 وعقمت في الاتوكليف عند درجة حرارة 121م لمدة 30 دقيقة، اما الوسط المغذي لمرق التمر نفس الخطوات بدون إضافة الآجار.

ملحق (4) الوسط المغذي لنواة التمر

نواة التمر	61 جرام / لتر
آجار	20 جرام / لتر
ماء	1000 مل

يتكون الوسط من 61جم نواة التمر المطحونة وأضيف الى 500مل من الماء المقطر ووضعت في حمام مائي عند درجة حرارة 80م لمدة 30 دقيقة، رشح باستخدام الشاش الطبي على الجانب الآخر تم إذابة 20جم من الآجار في 500مل من الماء المقطر المعقم وتم خلط المكونات وعدل تركيز ايون الهيدروجين عند 6.8 وعقمت في الاتوكليف عند درجة حرارة 121م لمدة 30 دقيقة، اما الوسط المغذي لمرق نواة التمر نفس الخطوات بدون إضافة الآجار.

ملحق (5) الوسط المغذي لمرق دكستروز البطاطس

البطاطس	200 جرام / لتر
دكستروز	20 جرام / لتر
ماء	1000 مل

ملحق (6) الوسط المغذي لمرق التمر

التمر	200 جرام / لتر
ماء	1000 مل

ملحق (7) الوسط المغذي لمرق نواة التمر

نواة التمر	61 جرام / لتر
ماء	1000 مل

ملحق (8) الوسط المغذي مرق مستخلص الشعير

الشعير	20 جرام / لتر
ماء	1000 مل