اختبار كفاءة عزلات من *Trichoderma* في استحثاث بعض الإنزيمات الدفاعية ضد الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici* في نباتات الطماطة

ورقاء سعيد قاسم الطائي
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل - العراق

الخلاصة

لغرض الحصول على عزلة من الفطر *Trichoderma* spp. كفوءة في المكافحة الاحيائية استخدمت ستة عزلات من المقاوم الحيوي *T. harzianum* وعزلة واحدة من المقاوم الحيوي *T.viride* لمكافحة مرض الذبول في نبات الطماطة المتسبب عن الفطر *Fusarium oxysproum* f.sp.*lycopersici*. وقد بينت النتائج تأثير عزلات عامل المكافحة الاحيائية في مجمل الصفات الحيوية المدروسة اذ حققت العزلات Th_1 و Th_3 و Th_4 و *T.viride* افضل قدرة تضادية وضدية، ومما يعزز ذلك تفوق هذه العزلات في مقدار الكتلة الحية المتحققة وعدد الابواغ المنتجة فضلاً عن قدرتها على خفض دالة الاس الهيدروجيني للوسط. وكذلك بينت النتائج قدرة هذه العزلات على استحثاث المقاومة الجهازية في النباتات من خلال رفع فعالية الانزيمات بيروكسيديز وبولي فينول اوكسيديز وكتاليز في جذور نبات الطماطة وتباينت هذه القدرة بين العزلات وتفوقت العزلتين Th_3 و *T.viride* معنوياً بشكل عام في كفاءتها على رفع فعالية هذه الانزيمات إذ بلغت للعزلة Th_3 ١.١٩٢ و٠.٧٢٤ و ٠.٠٦٤ دقيقة / غم وزن رطب على التوالي ، اما العزلة *T.viride* فقد بلغت فعالية الإنزيمات فيها ١.٢٨٨ و٠.٥٦٤ و٠.٠٥٤ دقيقة / غم وزن رطب على التوالي وانعكس ذلك في زيادة محتوى الفينولات الكلي في جذور نبات الطماطة الذي بلغ ١.٤٢ و ١.١٢ لكل منهما على التوالي.

المقدمة

تلعب أمراض النبات دورا مباشرا في التأثير على الموارد الزراعية اذ تسبب بحدوث خسائر كبيرة في الانتاج الزراعي ومنها ممرضات التربة على اختلاف انواعها وتعد الفطريات أكثر هذه الممرضات تأثيرا مثل *Phythium* و *Phytophthora* و *Rhizoctonia* و *Fusarium* وهي من الفطريات الأكثر انتشارا ولها دور مهم في التأثير الاقتصادي على المحاصيل الزراعية (Benitez وآخرون، ٢٠٠٤). واتجه الاهتمام إلى السيطرة الاحيائية في التجارب التطبيقية على أمراض النبات وذلك لزيادة الخوف حول درجة الأمان والتأثير البيئي من الاستخدام المفرط للمبيدات الكيمياوية وهذا يمكن ان يقودنا إلى تطوير المطلق الاحيائي لعمل المبيدات (Randal و Tu، ٢٠٠٣و Fravel، ٢٠٠٥). تتم السيطرة الإحيائية على امراض النبات من خلال آليات مختلفة يمتلكها عامل المكافحة الإحيائية ومنها إنتاج المضادات الحيوية، التنافس أو التطفل المباشر أو ان يستحث المقاومة لدى العائل ضد الممرض (Fogliano وآخرون، ٢٠٠٢ و Everett وآخرون، ٢٠٠٥ وHaggag وآخرون، ٢٠٠٧). تعد الأنواع التابعة لجنس *Trichoderma* spp. من الفطريات المهمة الواسعة الانتشار بيئيا إذ تنتشر في التربة والمواد العضوية المتحللة ومتبقيات اشجار الغابات، وهي كعامل مكافحة احيائية ناجح ضد العديد من الممرضات النباتية لأنها تمتلك أشكال متغايرة من السيطرة ضد الفطريات الممرضة، حيث انها تنافس الممرض على الغذاء أو تنتج مركبات ذات تأثير سمي أو انزيمات محللة للجدر الخلوية مثل الانزيمات كايتنيز Chitinases و كلوكونيز Glucanases وبروتيز Proteases، وكذلك تشجع نمو النبات وقدرته على التحمل والدفاع عن نفسه ضد الممرضات (Kullnig وآخرون، ٢٠٠٠ و Samuels، ٢٠٠٤ و Boureghda وآخرون، ٢٠٠٨). ومن الانواع الاكثر استخداما في مجال المكافحة الحيوية *T.harzianum* و*T.viride* و *T.virens* والتي تمتلك العديد من السلالات المستخدمة كعوامل للمكافحة الاحيائية للعديد من الممرضات النباتية الفطرية (Grondona وآخرون، ١٩٩٧ و Benitez وآخرون، ٢٠٠٤). ومن هنا جاء هدف الدراسة في اختبار عدة عزلات للفطر *Trichoderma* spp. وفق معايير المكافحة الاحيائية ضد الفطر *Fusarium oxsporum* f.sp.*lycopersici* الذي يعد من أكثر الفطريات الممرضة لنبات الطماطة مسببا

تاريخ تسلم البحث ٢٠١٠/٩/١٥ وقبوله ٢٠١٠/١٠/٢٧

مرض الذبول الفيوزارمي عليها وفي قدرة هذه العزلات على استحداث بعض الإنزيمات الدفاعية فيها، ويصيب الفطر الممرض النبات في مراحل مختلفة من النمو وان اوضح الاعراض تحدث في مراحل ما بين مدة التزهير

وعقد الثمار ويبقى النبات حيا لمدة غير محددة وتظهر عليه اعراض التقزم وانتاج ثمار مختزلة وغالبا ما تتعفن وتسقط على الارض ويكون المجموع الجذري للنبات المصاب مختزلا مقارنة بالمجموع الجذري للنبات السليم (Agrios، ٢٠٠٥وHibar واخرون، ٢٠٠٧).

مواد البحث وطرائقه

عامل المكافحة الاحيائية: استخدمت عزلات عامل المكافحة الاحيائية العائدة للجنس *Trichoderma* spp. وهي ستة عزلات للنوع *Trichoderma harzianum* Rifai وعزلة واحدة للنوع *T.viride* والتي تم الحصول عليها من قسم وقاية النبات/ كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل.

عزل وتشخيص الممرض: عزل الفطر الممرض من جذور نبات الطماطة (*Lycopersicum esculentum*) التي اظهرت أعراض الذبول، اخذت الجذور وغسلت بالماء الجاري للتخلص من الشوائب والاتربة ثم قطعت إلى قطع صغيرة لا تتجاوز اطوالها ١سم وعقمت سطحيا بغمرها في محلول هايبوكلورايت الصوديوم NaOCL ١% لمدة ثلاث دقائق، ثم وضعت على الاطباق الحاوية على وسط مستخلص البطاطا والدكستروز والاكار Potato Dextrose Agar(PDA) المدعم بالمضاد الحيوي Chloramphenicol بتركيز ١٠٠ ملغم/لتر وبواقع خمس قطع من الجذور لكل طبق.حضنت الاطباق عند الدرجة الحرارية (٢٧±٢)° سليزية لمدة (٥-٧) ايام مع المراقبة اليومية خلال فترة التحضين، شخص الفطر المعزول اعتمادا على المفاتيح التصنيفية التي أوردها Barnett وHunter (٢٠٠٦) لمرتبة الجنس و Booth (١٩٧١ ، ١٩٧٧) لمرتبة النوع.

إختبار القدرة التضادية: اختبرت القدرة التضادية لعزلات عامل المكافحة الاحيائية *Trichoderma* spp. ضد الفطر الممرض *Fusarium oxsporum* f.sp.*lycopersici* بتقنية الزرع المزدوج Dual Culture Technique (DCT) على طبق بتري حاوي على الوسط الغذائي PDA بقطر ٩ سم، إذ قسمت قاعدة الطبق من الخارج بخط فاصل إلى نصفين متساويين، لقح مركز النصف الاول بقرص قطره ٥ ملم اخذ من حافة مزرعة حديثة للفطر الممرض بعمر خمسة أيام ولقح مركز النصف الثاني للطبق بقرص قطره ٥ ملم اخذ من حافة مزرعة حديثة من عزلات عامل المكافحة الاحيائية وبمعدل ثلاث مكررات لكل معاملة، أما معاملة المقارنة فقد لقح كلا نصفي الطبق بقرص من الفطر الممرض *Fusarium oxsporum* f.sp.*lycopersici* ، حضنت الاطباق في درجة حرارة (٢٧±٢)° سليزية. حسبت درجة التطفل تبعا لمقياس Bell وآخرون (١٩٨٢)، وكما يلي:

الدرجة	الوصف
١	الفطر المقاوم يغطي كامل الطبق
٢	الفطر المقاوم يغطي ثلثي الطبق والثلث الباقي لنمو الفطر الممرض.
٣	نمو الفطر المقاوم يغطي نصف الطبق ويغطي الفطر الممرض النصف الآخر وعدم وجود منطقة فاصلة بينهما.
٤	نمو الفطر المقاوم يغطي ثلث المساحة والفطر الممرض يغطي الثلثين.
٥	الفطر المقاوم لا ينمو ويغطي الفطر الممرض الطبق بالكامل

*يعد المقاوم الذي يقع ضمن الدرجتين ١ و ٢ ذو قدرة تطفلية عالية.

اختبار القدرة الضدية للفطر الاحيائي *Trichoderma* spp.: حضر الوسط الغذائي السائل (PSB) Potato Sucrose Broth المكون من مستخلص ٢٠٠ غم من البطاطا و ٢٠ غم سكروز/ لتر ماء مقطر، وزرع في دوارق مخروطية الشكل سعة ٢٥٠ مل وبمعدل ١٠٠ مل/دورق. عقم الوسط الغذائي بجهاز الموصدة لمدة ٢٠ دقيقة، بردت الدوارق ولقح كل منها بقرصين بقطر ٥ ملم من مستعمرات نقية فتية من عزلات عامل المكافحة الاحيائية *Trichoderma* spp. المنماة على وسط PDA بعمر سبعة ايام وبواقع ثلاث مكررات لكل عزلة، ثم حضنت الدوارق عند درجة حرارة (٢٧±٢)° سيليزية لمدة ١٤ يوما مع مراعاة رج محتويات الدوارق كل ٢-٣ يوم. بعد انتهاء فترة التحضين اخرجت الدوارق الحاوية على المزارع النامية من الحاضنة ورشحت خلال ورق ترشيح نوع Whatman No.1 معلومة الوزن مسبقا وذلك لغرض تقدير الكتلة الحيوية وذلك بتجفيف هذه الاوراق الحاوية على المستعمرات النامية في فرن كهربائي في درجة حرارة ٧٠م° سيليزية لمدة ٢٤ ساعة (AOAC، ١٩٨٠). اما الراشح فقد قدرت فيه دالة الاس الهيدروجيني pH باستخدام جهاز pH meter لبيان الاس الهيدروجيني النهائي لراشح مزارع عزلات *Trichoderma* spp.، وبعد ذلك تمت عملية الترشيح باستعمال millipore filter بقطر ٠.٢٢ مايكروميتر. ولبيان القدرة

الضدية لهذه العزلات ضد الفطر الممرض استخدم المستوى ٥٠% من راشح مزرعة عامل المكافحة الاحيائية مع الوسط الغذائي PDA المضاف له المضاد الحيوي Chloramphenicol بتركيز ١٠٠ ملغم/لتر اما معاملة المقارنة فقد استعيض فيها عن الراشح الفطري باضافة الماء المقطر إلى الوسط الغذائي. صبت الأوساط في اطباق بتري معقمة قطر ٩ سم ولقحت باقراص بقطر ٥ ملم من مزرعة فتية للفطر الممرض *Fusarium oxsporum* f.sp.*lycopersici* وبثلاث مكررات لكل معاملة، حضنت الاطباق في درجة حرارة (٢٧±٢)° سيليزية وتم حساب نسب التثبيط المئوية بقياس متوسط قطرين متعامدين لمستعمرة الفطر يمران بمركز الطبق بعد امتلاء نموها في معاملة المقارنة، وبتطبيق المعادلة الآتية:

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{قطر المستعمرة في معاملة المقارنة} - \text{قطر مستعمرة المعاملة}}{\text{قطر المستعمرة في معاملة المقارنة}} \times ١٠٠$$

تقدير عدد الابواغ: قدر عدد الابواغ لعزلات عامل المكافحة الاحيائية *Trichoderma* spp. باستخدام مزارع بعمر ١٠ أيام وبواقع ثلاث مكررات لكل عزلة، حضر المعلق البوغي باخذ (٣) أقراص بوساطة ثاقب فلين بقطر ٥ ملم من الحافة الخارجية للمزرعة، نقلت الاقراص إلى قناني زجاجية محكمة السد تحتوي على ١٠ مل من الماء المقطر المضاف اليه المادة الناشرة Tween 80 بتركيز ١%، رجت القناني جيدا باستخدام خلاط دوراني Rotary mixer لتفتيت قرص الاكار وكتل ابواغ الفطر، رشح العالق البوغي بتمريره من خلال قمع زجاجي حاوٍ على شاش معقم للتخلص من الشوائب والخيوط الفطرية والحصول على العالق البوغي، استخدمت شريحة عد الخلايا الحية Haemacytometes لتقدير كثافة العالق البوغي المحضر وتثبيت القراءات وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة.

استحثاث المقاومة : جري الاختبار باستخدام اطباق من البولي ستايرين بابعاد ٦٥×٤٠×٦ سم يحتوي الطبق الواحد على ٩٦ حجرة زراعة مملوءة بخليط من البتموس والزميج المعقم بنسبة ١: ١. نقعت بذور الطماطة من نوع سوبر كوين بمعلق ابواغ عزلات عامل المكافحة الاحيائية *Trichoderma* spp. بتركيز ٥×١٠^{٦} بوغ/مل (تم تحضير عالق الابواغ كما موضح في الفقرة السابقة) لمدة ساعة مع طلاء البذور بمادة الهولاس بتركيز ٥% كمادة لاصقة (Aziz وآخرون، ١٩٩٧) ثم رفعت وتركت البذور في ظروف المختبر لمدة ٢٤ ساعة قبل الزراعة. زرعت البذور بواقع بذرة واحدة في كل حجرة، ثم قلعت النباتات النامية بعد ظهور اول ورقتين حقيقيتين لكل منها، وبعد نزع النباتات من التربة تم غسلها بالماء الجاري للتخلص من الاتربة العالقة بها . طحنت الجذور وسحقت في هاون خزفي مع ٢ مل من دارئ الفوسفات ذي الاس الهيروجيني ٧ (Howell وآخرون، ٢٠٠٠) ثم وضعت في انابيب اختبار واكمل الحجم إلى ١٠ مل، خضعت هذه الأنابيب الحاوية على خليط أنسجة الجذور والمحلول الدارئ إلى عملية انتباذ بسرعة ٣٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٥ دقائق ، حفظ الجزء الطافي في درجة صفر° سليزية لحين قياس فعالية الإنزيمات.

١- تقدير فعالية الانزيم بيروكسيديز: قدرت فعالية إنزيم البيروكسيديز تبعا لطريقة Howell وآخرون (٢٠٠٠) وذلك بمتابعة الزيادة الحاصلة في الامتصاص الضوئي الناتج من اكسدة مادة كوايكول Guaiacol كركيزة للانزيم عند الطول الموجي ٤٢٠ نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer ، تم حساب فعالية الانزيم باستخدام المعادلة الآتية :

$$\text{فعالية الانزيم / دقيقة / غم نسيج رطب} = \frac{\Delta أ \times ٣}{\Delta ن}$$

حيث Δ أ : التغير في امتصاص الضوء ، Δن: المدة الزمنية المستغرقة للتغيير في الامتصاص

٢- تقدير فعالية الانزيم بولي فينول اوكسيديز: قدرة فعالية الانزيم تبعا لطريقة Shi وآخرون (٢٠٠٢) وذلك بمتابعة الزيادة الحاصلة في الامتصاص الضوئي الناتج من اكسدة مادة كاتيكول Catechole عند الطول الموجي ٤٢٠ نانوميتر كركيزة للانزيم، وحسبت فعالية الانزيم باستخدام المعادلة الموضحة اعلاه.

٣- فعالية الانزيم كتاليز: اتبعت طريقة Kato و Shimizu (١٩٨٧) في التقدير وذلك بمتابعة التغيير الحاصل في الامتصاص الضوئي الناتج من اكسدة بيروكسيد الهيدروجين كركيزة للانزيم عند الطول الموجي ٢٤٠ نانوميتر، وحسب فعالية الانزيم كذلك تبعا للمعادلة الموضحة اعلاه.

تقدير محتوى الفينولات الكلي : تم التقدير تبعا لطريقة Zieslin و Ben-Zaken (١٩٩٣) ، وذلك بأخذ ١ غم من جذور نبات الطماطة بوحقها في ١٠ مل من الميثانول بتركيز ٨٠%، وضعت الانابيب في حمام

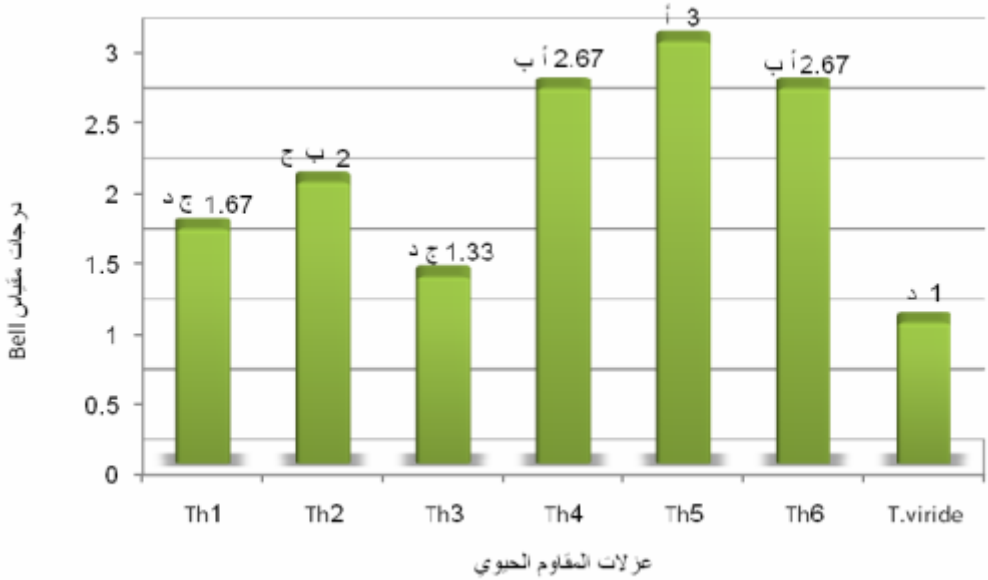
مائي بدرجة ٧٠ °سيليزية لمدة ٢٠ دقيقة، اخذ المستخلص ورشح من خلال اوراق Whatman No.1. اخذ ١ مل من مستخلص الجذور واضيف اليه ٥ مل من الماء المقطر و ٢٥٠ مايكروليتر من كاشف فولن ١ عيارية، ترك المزيج لحين تطور اللون الازرق وقرأ الامتصاص الضوئي عند الطول الموجي ٧٢٥ نانوميتر، حضر المنحنى القياسي لتقدير الفينولات الكلي باستخدام مادة كاتيكول Catechole.

التحليل الإحصائي : استخدم التصميم العشوائي الكامل CRD ذي الاتجاه الواحد One way analysis of variance في تنفيذ التجارب المختبرية وحللت النتائج وفق نظام SAS واختبرت المتوسطات باستخدام اختبار دنكن المتعدد المدى Duncans multiple range test وبمستوى احتمال ٥%.

النتائج والمناقشة

اظهرت عملية العزل من النباتات المصابة عن ظهور الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici* بصورة نقية من جذور نباتات الطماطة المعزولة منها، ولوحظت المستعمرة الفطرية المنماة على الوسط PDA بعمر (٥-٧) ايام بلون ابيض قطني مرتفعة قليلا وذات حواف متعرجة قليلا ايضاً وفي ظهر المستعمرة لوحظ وجود صبغة بلون بنفسجي يميل إلى البنفسجي الغامق، وعند الفحص المجهري للفطر تم ملاحظة ابواغه الثلاثة بالوان شفافة إلى صفراء باهته، الابواغ الصغيرة Microconidia والتي تتواجد بغزارة وباشكال مختلفة بيضوية او قارورية او كلوية وبشكل خلية مفردة او خليتين تراوحت ابعادها ٢-٢.٧ × ١١-١٢ مايكروميتر. اما الابواغ الكبيرة Macroconidia والابواغ الكلاميدية Chlamidospores فكانت محدودة العدد وذات اشكال مختلفة، فالابواغ الكبيرة كانت شفافة وبشكل منجلي منحنية ولها جدار نحيف ومقسمة بجدر مستعرضة تراوحت بين ٣-٥ حواجز، تراوحت ابعادها ٣.٥-٤.٥ × ٣٢-٣٩ مايكروميتر عندما تكون ثلاثية الحواجز العرضية فيما تراوحت ابعادها ٣.٥-٤.٥ × ٤٥-٥٦ مايكروميتر عندما تكون خماسية الحواجز العرضية وللبوغ الكبير خلية قاعدية قدمية Foot Cell وخلية قمية Apical Cell، اما الابواغ الكلاميدية فكانت تبدو بشكل كروي وتمتلك جدار سميك املس او خشن وتتواجد بشكل مفرد او مزدوج واحيانا بشكل سلسلة اما طرفية او بينية الموقع تتراوح ابعادها ١٠.٥-١١.٤ مايكروميتر، وهذه الصفات تنطبق مع المواصفات المثبتة لتشخيص الفطر عند Booth (١٩٧١، ١٩٧٧) و Summerell واخرون (٢٠٠٣).

تبين من دراسة بعض الصفات الحيوية لعزلات عامل المكافحة الاحيائية للجنس *Trichoderma* spp.، ان عزلات الفطر حققت قدرة تطفيلية عالية ضد الفطر الممرض *Fusarium oxsporum* f.sp.*lycopersici* تحت ظروف المختبر (الشكل ١)، اذ تراوحت درجة التطفل ما بين ١-٣. ويظهر من النتائج ان العزلات الثلاث Th_1 و Th_3 و *T.viride* تفوقت في مقدرتها التطفلية على بقية العزلات اذ بلغت ١.٦٧ و ١.٣٣ و ١ لكل منهم على التوالي ثم العزلة Th2 بلغت مقدرتها التطفلية ٢ وتلتهم بقية العزلات، اذ حققت العزلتين Th_4 و Th_6 قدرة تطفلية بلغت ٢.٦٧ لكليهما وكانت اقلها قدرة تطفلية ا لزلة Th_5 اذ بلغت ٣ وفقاً لمقياس Bell (Bell واخرون، ١٩٨٢). ان قدرة الفطر *Trichoderma* التضادية ضد الفطر *Fusarium oxsporum* f.sp.*lycopersici* تعود الى واحد او اكثر من الآليات المتعددة التي يمتلكها، ومنها تطفله المباشر على الغزل الفطري وذلك نتيجة تجمع والتصاق ابواغ عامل المكافحة الاحيائية وتكوين عقد هيفية وخطاطيف او اعضاء التصاق على الغزل الفطري للفطر الممرض، فضلاً عن سرعة نموها مقارنة بسرعة نمو مستعمرة الفطر الممرض (El-katatny واخرون، ٢٠٠٠ و Harman واخرون، ٢٠٠٤).



الشكل (١): يوضح التضادية لعزلات عامل المكافحة الاحيائية *Trichoderma* spp. وحسب مقياس (Bell، ١٩٨٢).

اضافة الى انتاج عزلات عامل المكافحة الاحيائية انزيمات محللة للجدر الخلوية والتي تعمل ضمن اليات التطفل والتضاد لتحطيم الجدار الخلوي مثل انزيمات Chitinase وβ-1,3-glycanase و Protease و Cellulase والتي لا تعد فقط ضرورة في التطفل للحد من نمو مستعمرة الفطر الممرض ولكنها تعمل على زيادة الفعالية التي يمتلكها المقاوم الحيوي وبالتالي زيادة تأثيره على الممرض (Hermosa واخرون، ٢٠٠٠ و DeMarco و Felix، ٢٠٠٢)، وهذا ما لاحظناه من مشاهدة نموات المستعمرة لعزلات *Trichoderma* فوق الغزل الفطري للـ *Fusarium oxsporum* f.sp.*lycopersici*. وهذا ما اشار اليه Harman واخرون (١٩٩٣) بان انتاج Rifai *T.harzianum* لانزيمات كاتينيز كانت مسؤولة عن زيادة فعالية المقاومة الحيوية لديها. وذكرا De Marco و Felix (٢٠٠٢) ان قابلية المقاوم الحيوي *T.harzianum* في انتاج انزيمات Protease المحلل للجدار الخلوي للفطر الممرض *Crinipellis perniciosa* المسبب لمرض مكنسة الساحرة Witche's broom disease في نبات الكاكاو دعمت اليات المقاومة الحيوية للفطر، وذلك لان الهيكل التركيبي لجدران الخلية الفطرية يتكون من الكايتين والكلوكان والبروتين والانزيمات التي تحلل هذه المكونات اذ تواجدت في المقاوم الحيوي تلعب دور ناجح في تحليل الجدار الخلوي للممرض (Carsolio واخرون، ١٩٩٩).

تبين نتائج الجدول (١) القدرة الضدية لراشح مزارع عزلات عامل المكافحة الاحيائية ضد الفطر *Fusarium oxsporum* f.sp.*lycopersici*. اذ تباينت النسبة المئوية لتثبيط الممرض ما بين ١٨.٠٩ الى ٨.٥١% وكان افضلها تضاداً العزلات Th_1 و Th_2 و Th_3 و Th_4 و *T.viride* وبنسب (١٤.٨ و ١٣.٥١ و ١٨.٠٩ و ١٧.٠٢ و ١٤.١٨)% على التوالي تلتها بقية العزلات محققة اقل نسبة مئوية للعزلتين Th_5 و Th_6 وبنسبة ٨.٥١ و ٩.٢٢ على التوالي. تتفق هذه النتائج مع العديد من الدراسات التي اشارت الى كفاءة راشح مزرعة الفطر *Trichoderma* في تثبيط نمو الفطريات الممرضة للنبات، وهذا من القواعد في العملية الضدية التي تقوم بها عزلات المقاوم الحيوي وذلك من خلال انتاج مواد ذات اوزان جزيئية واطئة منتشرة او مواد ايضية كالمضادات الحيوية والانزيمات او مواد سامة تؤثر على الممرضات (Schirmböck واخرون، ١٩٩٤ و Leclere واخرون، ٢٠٠٥). لان انواع *Trichoderma* spp. كمجموعة في إنتاج العديد من المضادات مثل gliotoxin و glioviridin و peptaibols و alamethicins و harzianic acid و heptelidic acid وغيرها من المركبات التي تعرف كمثبطات للنمو لمدى واسع من الممرضات (Vey واخرون، ٢٠٠١ و Djonovic، ٢٠٠٥).

الجدول (١): الصفات الحيوية لعزلات عامل المكافحة الاحيائية *Trichoderma* spp.

عزلات عامل المكافحة الاحيائية	الصفات المدروسة			
	* القدرة الضدية (% للتثبيط الممرض)	* الكتلة الحيوية (غم وزن جاف/١٠٠مل)	* لوغارتم عدد الابواغ/سم^2	* دالة الاس الهيدروجيني pH
Th1	١٤.١٨ أ	٠.٣٢ ب	٦.٢٧ أ	١.٠٧ أب
Th2	١٣.٥١ أ	٠.٣٩ ب	٦.٠٤ب	١.٠٠ أب
Th3	١٨.٠٩ أ	٠.٥٩ أ	٦.٣٤ أ	١.٥٠ أ
Th4	١٧.٠٢ أ	٠.٥٤ أ	٦.٢٩ أ	١.٥٠ أ
Th5	٨.٥١ أب	٠.٢ ج	٥.٥٤ ج	٠.٨ ب
Th6	٩.٢٢ أب	٠.٢٣ ج	٦.٠٩ب	٠.٩٣ ب
T.viride	١٤.١٨ أ	٠.٣٥ ب	٦.٤٢ أ	١.٩٣ أ

* المتوسطات التي تحمل حروفا متشابهة لكل عمود لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن المتعدد المدى ولمستوى احتمال ٥%.

وتزداد فعالية عمل الانزيمات المحللة والمواد المضادة المنتجة إذا عملا معاً وتصبح آلية عملها على مستوى عالي في المقاوم الحيوي مما يمكن ان يتم في عمل كل آلية لوحدها اذ يشتركا معاً في تحليل الجدار الخلوي (Monte، ٢٠٠١ و Benitez واخرون، ٢٠٠٤).وهذا ما اشار اليه Howell (٢٠٠٣) ان التأثير المشترك بين endochitinase والمضاد الحيوي gliotoxin الناتج من فعالية الفطر *T.harzianum* وبين الانزيمات المحللة الاخرى والمضاد الحيوي peptaibols ثبط عملية التبويغ في الفطر الممرض *Botrytis cinerea*. و ذكر El-Katatny واخرون (٢٠٠٠) بان راشح مزرعة الفطر *T.harzianum* يحتوي على انزيمي Chitinase و β-1,3-glucanase القادرين على تحليل الغزل الفطري الجاف والطري للفطر الممرض *Sclerotium rolfsii* فضلاً عن تثبيطهما لنمو الفطر الممرض بنسبة ٦١.٨%. تبين النتائج في الجدول (١) تباين مقدار الكتلة الحيوية لعزلات عامل المكافحة الاحيائية *Trichoderma* spp. اذ بلغ اعلى متوسط لمقدار الكتلة الحيوية في العزلتين Th_3 و Th_4 ٠.٥٩ و ٠.٥٤ غم / ١٠٠ مل على التوالي تلتها العزلات Th_1 و Th_2 و *T.viride* اذ حققت متوسطات متقاربة لمقدار الكتلة الحيوية، في حين بلغ ادنى متوسط لمقدار الكتلة الحيوية ٠.٢ و ٠.٢٣ للعزلتين Th_5 و Th_6 على التوالي. ان مقدار الزيادة المتحققة في الكتلة الحية لعزلات عامل المكافحة الاحيائية اعطى دلالة لكفاءتها العالية في انتاج الابواغ، اذ تباينت العزلات المستخدمة في عدد الابواغ المنتجة في وحدة المساحة ضمن المستعمرة، وتفوقت العزلات Th_1 و Th_3 و Th_4 و *T.viride* بعدد الابواغ المنتجة وبلغ لوغارتم متوسط عدد الابواغ ٦.٢٧ و ٦.٣٤ و ٦.٢٩ و ٦.٤٢ عدد الابواغ/سم^2 على التوالي. وحققت العزلتين Th_2 و Th_6 نسب متقاربة في لوغارتم عدد الابواغ/سم^2، وبلغ ادنى متوسط لوغاريتم عدد الابواغ ٥.٥٤ في مزرعة العزلة Th_5. ان زيادة الكتلة الحيوية تدل على قدرة عامل المكافحة الاحيائية في استغلال الوسط استغلالاً امثلاً مما يعزز ازدياد فرص وجوده في بيئته ومن ثم قدرته في النشاط والتكاثر، كما ان التبويغ العالي للمقاوم الحيوي يعطيه ميزة في زيادة من فرص نجاح استخداماته في المكافحة من خلال زيادة مساحة انتشاره وطول مدة بقاءه ومن ثم زيادة كفاءته في مجمل فعالياته الحيوية، كما يعزز ذلك فرص احداث متغيرات حيوية كفوءة حول الجذر كالتطفل والتضاد والتحلل (Harman واخرون، ٢٠٠٤ و Ibraheem، ٢٠٠٩). كذلك تبين النتائج في الجدول (١) قدرة عزلات عامل المكافحة الاحيائية *Trichoderma* spp. في خفض دالة الاس الهيدروجيني للوسط والتي تباينت في ذلك، وحققت العزلات Th_3 و Th_4 و *T.viride* اعلى قيمة للانخفاض في دالة الاس الهيدروجيني بمعدلات بلغت ١.٥ و ١.٥ و ١.٩٣ على التوالي. في حين بلغت اقل قيمة للانخفاض في دالة الاس الهيدروجيني في العزلتين Th_5 و Th_6 بمعدل ٠.٨ و ٠.٩٣ على التوالي، علماً بان دالة الاس الهيدروجيني للوسط من دون زراعة عامل المكافحة الاحيائية بلغت ٦.٥.ان قدرة عزلات الفطر *Trichoderma* في خفض الاس الهيدروجيني للوسط يدل على كفاءتها لان الـ *Trichoderma* تكون اكفأ في تأثيرها في الترب الحامضية اكثر من القاعدية وتمتلك القدرة على زيادة حموضة وسطها الحيوي بانتاجها للاحماض العضوية (Benitez واخرون، ٢٠٠٤). ويعد ذلك واحد من الآليات التي تتبعها *Trichoderma* لتوفير الظروف ا | لاطى للنمو وتحوير محيطها بما يلائم فعاليتها الايضية كانتاج البروتينات المختلفة والانزيمات وفي نفس الوقت عدم

توفير ظروف ملائمة للممرض لاحداث الاصابة (Caracuel واخرون، ٢٠٠٣). وهذا يتفق مع ما ذكره El-Katatny واخرون، ٢٠٠٠ بان الاس الهيدروجيني الامثل لانتاج انزيمي Chitinase و β-1,3-glucanase يتراوح ما بين ٥.٥-٦ اس هيدروجيني لتحقيق افضل اداء للمقاوم الحيوي *T.harzianum*. وكذلك فان قدرة عزلات انواع المقاوم الحيوي *Trichoderma* spp. على خفض الاس الهيدروجيني للوسط له اهمية بالغة في زيادة جاهزية بعض المغذيات في التربة ولاسيما عنصر الفسفور. وهذا ما اشار اليه Anusuya و Jayarajan (١٩٩٨) و Harman (٢٠٠٠) في ان النشاط الحيوي للفطرين *T.viride* و *T.harzianum* يزيد من قدرتها على اذابة الفسفور وزيادة جاهزيته للنبات بعد خفض قيمة دالة الاس الهيدروجيني.

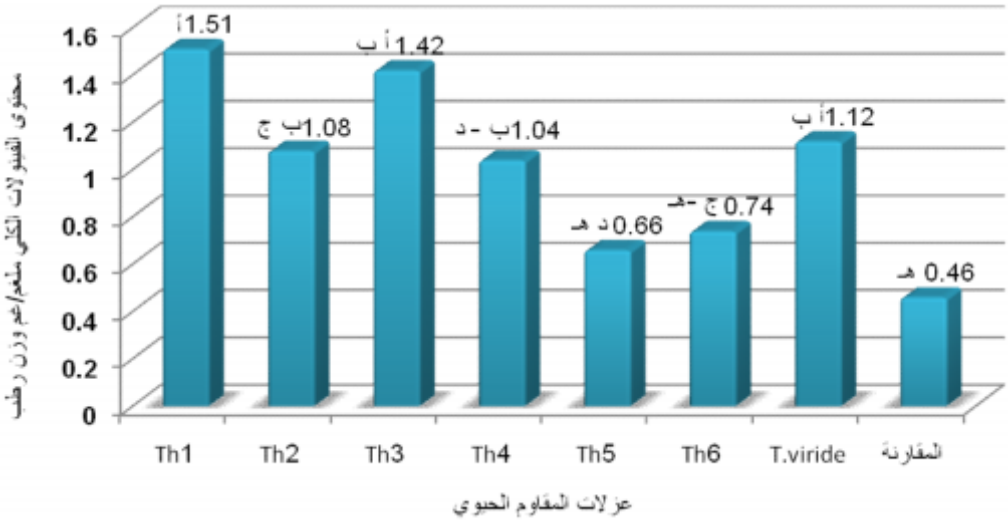
يبين الجدول (٢) قدرة عزلات عامل المكافحة الاحيائية *Trichoderma* spp. في استحثاث المقاومة في نبات الطماطة وذلك من خلال رفع فعالية الانزيمات بيروكسديز وبولي فينول اوكسيديز وكتاليز. اذ تفوقت العزلتين Th_3 و *T.viride* معنوياً في رفع فعالية الانزيم بيروكسديز وبلغت فعالية الانزيم ١.١٩٢ و ١.٢٨٨ / دقيقة/غم وزن رطب على التوالي ثم العزلة Th_1 محققة فعالية انزيمية ٠.٧١٤ / دقيقة /غم وزن رطب تلتهم بقية العزلات Th_2 و Th_4 و Th_5 و Th_6 محققين فعالية متقاربة وبفارق معنوي لجميع العزلات عن معاملة المقارنة اذ بلغت فعالية الانزيم فيها ٠.١٥٧ /دقيقة/غم وزن رطب. وكذلك فقد تفوقت عزلات عامل المكافحة الاحيائية في رفع فعالية الانزيم بولي فينول اوكسيديز، الجدول (٢). اذ تفوقت العزلات Th_3 و Th_4 و *T.viride* وبلغت فعالية الانزيم في النباتات المعاملة ٠.٧٢٤ و ٠.٦٩٢ و ٠.٥٦٤ /دقيقة/غم وزن رطب على التوالي، تليها العزلتان Th_1 و Th_6 اذ بلغت فعالية الانزيم ٠.٥٢٦ و ٠.٥٣٩ /دقيقة/غم وزن رطب على التوالي ثم Th_5 في حين لم تتسب العزلة Th_2 في احداث زيادة في فعالية الانزيم بولي فينول اوكسيديز اذ لم تختلف معنوياً عن معاملة المقارنة التي بلغت فعاليته الانزيم فيها ٠.٣٣٩ /دقيقة/غم وزن رطب. اما بالنسبة لانزيم كتاليز فان قدرة عزلات عامل المكافحة الاحيائية *Trichoderma* spp. واضحة في رفع فعاليته، اذ تفوقت العزلاتTh_2 و Th_3 و Th_4 و *T.viride* في رفع فعالية الانزيم الى ٠.٠٥١ و ٠.٠٦٤ و ٠.٠٤٢ و ٠.٠٥٤ /دقيقة/غم وزن رطب على التوالي، تليهما العزلات Th_1 و Th_5 و Th_6 وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة التي بلغت فعالية الانزيم فيها ٠.٠٠٧ /دقيقة/غم وزن رطب.

الجدول (٢): تأثير عزلات المقاوم الحيوي *Trichoderma* spp. في فعالية بعض الانزيمات لبادرات نبات الطماطة.

عزلات عامل المكافحة الاحيائية	فعالية الانزيم / دقيقة / غم وزن رطب		
	* بيروكسيديز	* بولي فينول اوكسيديز	* كتاليز
مقارنة	٠.١٥٧ هـ	٠.٣٣٩ د هـ	٠.٠٠٧ ج
Th1	٠.٧١٤ ب ج	٠.٥٢٦ ب ج	٠.٠٣٢ ب ج
Th2	٠.٤٣٣ د	٠.٢٢٨ هـ	٠.٠٥١ أب
Th3	١.١٩٢ أ	٠.٧٢٤ أ	٠.٠٦٤ أ
Th4	٠.٥٧٧ ج د	٠.٦٩٢ أ	٠.٠٤٢ أب
Th5	٠.٤٧٢ د	٠.٣٩٦ ج د	٠.٠٢٨ ب ج
Th6	٠.٥٢٥ د	٠.٥٣٩ ب ج	٠.٠٣٦ أ-ج
T.viride	١.٢٨٨ أ	٠.٥٦٤ أب	٠.٠٥٤ أب

* المتوسطات التي تحمل حروفا متشابهة لكل عمود لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن المتعدد المدى ولمستوى احتمال ٥%.

من الشكل (٢) تتضح قدرة عزلات عامل المكافحة الاحيائية *Trichoderma* spp. في زيادة محتوى الفينولات الكلي في نبات الطماطة، اذ تفوقت العزلات Th_1 و Th_3 و *T.viride* معنوياً في رفع مستوى الفينولات الكلي وبلغت ١.٥١ و ١.٤٢ و ١.١٢ملغم/غم وزن رطب على التوالي تلتها العزلة Th_2 و Th_4 وبفارق معنوي بلغت ١.٠٨ و ١.٠٤ملغم /غم وزن رطب، ثم بقية العزلات وكانت اقلهم العزلة Th_5 محققة نسبة ٠.٦٦ ملغم/غم وزن رطب من محتوى الفينولات الكلي والذي كان برغم انخفاض نسبته اعلى من نسبة محتوى الفينولات الكلي في معاملة المقارنة لنبات الطماطة التي بلغت ٠.٤٦ ملغم/غم وزن رطب.



الشكل (٢): تأثير عزلات المقاوم الحيوي *Trichoderma* spp. في محتوى الفينولات الكلي لبادرات نبات الطماطة.

وتبين النتائج السابقة قدرة عزلات المقاوم الحيوي *Trichoderma* spp. على استحثاث انتاج الانزيمات بيروكسيديز وبولي فينول اوكسيديز وكتاليز مع كفاءتها في رفع محتوى الفينولات الكلي، والتي تعد حالة ايجابية لان زيادة المحتوى من المواد الفينولية كاستجابة اولية لغزو المسببات المرضية للنبات يؤدي الى زيادة فعالية الانزيمين بيروكسيديز وبولي فينول اوكسيديز اللذان يؤكسدان الفينولات، اذ يعمل الانزيم الاول على اكسدة الفينول و O-dihydroxyphenol ويعمل الانزيم الثاني على اكسدة الكاتيكول (Ibraheem، ٢٠٠٩). وهذا يتفق مع ما ذكره Al-Tuwaijri (٢٠٠٩) في قدرة عزلتي المقاوم الحيوي *T.viride* و *Bacillus subtilis* في ازالة التأثيرات المرضية للفطريين *F.oxysporum* و *F.solani* المسببين لمرض تعفن جذور نبات الخيار وعلى نمو النبات ومسارات انشطته الايضية والانزيمية، اذ ادت المعاملة بالمقاوم الحيوي الى زيادة معنوية في جميع صفات النمو ومحتوى النبات من المركبات الفينولية وفي النشاط الانزيمي لكل من انزيمات بولي فينول اوكسيديز وبيروكسيديز وكتاليز والاميليز والسليوليز والكاربوكسي مثيل سليوليز. وهذا ما اشار اليه Brunner واخرون (٢٠٠٥) ان وجود المقاوم الحيوي *T.atrovirdie* على البذور اوسطح الجذور في تربة تحوي على الممرض *R. solani* زادت آلية الاستحثاث في النبات، وان مستخلص الجذور المعاملة بالمقاوم الحيوي *T.harzianum* لنبات الحمص لوحظ فيها زيادة فعالية phenylalanine ammonia lyase وبولي فينول اوكسيديز وانتاج المواد المثبطة trypsin وchymotrypsin وكذلك فان مستخلص الجذور المعاملة ثبط تماماً انزيم protease-2 في الفطر *F.oxysporum*، وبالتالي سبب طفل حلة مقاومة للممرض لحدوث تعفن الجذور الناجم عن مرض الذبول (Jayalakshmi واخرون، ٢٠٠٩). نستنتج من نتائج البحث كفاءة عزلات عامل المكافحة الاحيائية *Trichoderma* spp. في المقاومة الحيوية للفطر الممرض *F.oxysporum* وكفاءة هذه العزلات في استحثاث آلية المقاومة في نبات الطماطة وكان افضل هذه العزلات في ذلك العزلة Th_3 العائدة للنوع *T.harzianum* والعزلة *T.viride*، وهذا يدل على قدرة عزلات *Trichoderma* spp. على حماية النباتات ضد فطريات الجذور الممرضة مما جعل منها مقاومات حيوية ناجحة (Harman واخرون، ٢٠٠٤).

INVESTIGATING *Trichoderma* ISOLATES AS DEFENDER ENZYMES INDUCERS AGAINST *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici* IN TOMATO PLANT

Warka S.Q. Al-Taee
Dept. of Biology, College of Science, University of Mosul. Iraq
E.mail: wsqassim2004@yahoo.com

ABSTRACT

Inorder to get an effective isolate of *Trichoderma* as biocontrol agent, six isolates of *T.harzianum* and isolate of *T.viride* were used for control of *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici*, the cause of vascular wilt of tomato .Results revealed that the isolates of Th1, Th3, Th4 and *T.viride* were the best antagonisum fungi, these results were supported by marked highest biomass, reduced PH of culture media, and their sporulation. There isolates also improved significant induction of plant systemic disease resistance throughout inducing peroxidase, polyphenoloxidas and catalaze in tomato roots. Isolates of Th3 and *T.viride* were the most effective bicontrol agents since inducing of these enzymes by 1.192 and 1.288 min/g f.w for peroxidase and 0.724 and 0.564 min/ g f.w for polyphenoloxidase , and 0.065, 0.054 min/ g f.w for catalaze, respectively. Therefore, the total phenols accumulation in the roots were exceeded to 1.42 and 1.12 for each isolate, respectively.

المصادر

Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology, 5th ed. Academic Press. 922 pp.

Al-Tuwaijri , M.(2009).Role of the biocontrole agent *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilius* in elimination of the deteriorative effects of the root rot pathogens *Fusarium oxysporum* and *F.solani* on some metabolic and enzyme activates of cucumber plants. Egypt. J. Exp. Biol. 5: 29 –32 .

Anusuya ,D. and R. Jayarajan (1998).Solubilization of phosphorus by *Trichoderm viride* .Current Science 74: 464-466.

AOAC. "Association of Official Analytic Chemists" (1980). Official Methods of Analysis. 13th ed., , Washington, DC.

Aziz ,N.H.; M.Z. El-Fouly ; A.A.El-Essawy and M.A.Khalaf (1997).Influence of been seedling root exudates on the rhizosphere conolazation by Trichoderma lignorum for the control of Rhizoctonia solani . Bot.Bull.Acad. 38:33-39.

Barnett, H.L and B.B. Hunter (2006). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company. 241 pp.

Bell, D. K.; H.D. Wells and C.R. Markham(1982). In vitro antagonism of Trichoderma species against six fungal Plant Pathogens. Phytopathology 72: 379 – 382.

Benitez, T.; A.M. Rincon; M.C. Limon and A.C.Codon(2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Int. Microbiol. 7: 249-260.

Booth, C. (1971) *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 237pp.

Booth, C. (1977) Fusarium. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England, 357 pp.

Boureghda, H.; Z. Bouznad and C. Decock (2008). Cultural and molecular characterizations of some isolates of *Trichoderma* spp.. 26: 75-80.

Brunner K; S. Zeilinger; R. Ciliento; L.S. Woo; M. Lorito; C.R. Kubicek and R.L. Mack (2005). Improvement of fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. Appl. Environ. Microbiol. 7: 3959-3969.

Caracuel Z; M.I., Rancero; E.A. Espeso; C.I. Gonzalez-Verdejo; F.I., Garcia-Maceira and A. Di Pietro (2003). The pH signaling transcription factor PacC

controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. Mol. Microbiol. 48: 765-779.

Carsolio, C; N. Benhamou; S. Haran; C. Cortes; A. Gutierrez; I. Chet and A. Herrera-Esterlla (1999). Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene *ech2* in mycoparasitism. Appl. Environ. Microbiol. 65: 929-935.

De Marco, J.L. and C.R. Felix (2002). Characterization of aprotease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls coca plant witche's broom disease. BMC Biochemistry. 3: 1-7.

Djonovic ,S.(2005). Role of two secreted proteins from *Trichoderma virens* in mycoparasitism and induction of plant resistance .Ph.D. Dissertation, Texas A&M University .217pp.

El-Katatny, M.H; W. Somitsch; K.H. Robra; M.S. El-Katatny and G.M. Gübitz (2000). Production of chitinase and β-1,3-glycanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. Food Technol. Biotechnol. 38: 173-180.

Everett, K.R.; J.L. Vaneste; I.C. Hallett and M. Waller (2005). Ecological alternatives for disease management of fruit rot pathogens. New Zealand Plant Protection. 58: 55-61.

Fogliano, V.; M. Gallo; S. Wu; F. Scala and M. Lorito (2002). Pseudomonas lipepsipetides and fungal cell wall-degrading enzymes act synergistically in biological control. Molecular Plant Microbe. Inter., 15: 323-333.

Fravel, D. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. 43: 337-359.

Grondona, J; R. Hermosa; M. Tejada; M.D. Gomis; P.F. Mateos; P.D. Bridge; E. Monte and I. Garcia-Acha (1997). Physiological and biological character-rization of *Trichoderma harzianum* a biological control agent against soil borne fungal plant pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 63:3189-3198.

Haggag, W.M; H. Abedel-Latif and A. Mohamed (2007). Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. American-Eurasian J. of sustain. Agri., 1: 7-12.

Harman, G.E; C.K. Hayes; M. Lorito; R.M. Boadway; D.I. Pietro; A. Peter; C. Bauer and A. Tronsmo (1993). Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathology, 83: 313-318.

Harman , G . E .(2000) . Myths and dogmas of biocontrol change in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22 . Plant Dis. 84: 377 - 393 .

Harman G.E; Ch.R. Howell; A. Viterbo; I. Chet and M. Lorito (2004). *Trichoderma* species opportunistic, a virulent plant symbionts. Natur. Rev. Microbiol. 2: 43-58.

Hermosa, M.R.; I. Grondona; E.A. Iturriaga; J.M Diaz; C. Castro; E. Monte and I. Carcia (2000). Molecular characterization and indentification of biocontrol isolates *Trichoderma* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1890-1898.

Hibar ,K.;M. Daami and M.El Mahjoud (2007) . Induction of resistance in tomato plants aginst *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis lycopersici* by *Trichoderma* spp.. Tunisian J. Plant protect.2:47-58.

Howell, C. R.; L.E. Hanson ; R.D. Stipanovic and L.S. Puckhaber (2000). Induction of Terpenoid synthesis in cotton roots and control of Rhizoctonia solani seed treatment with Trichoderma virens. Phytopathology, 90: 248 – 252.

Howell, C.R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis. 78: 4-10.

Ibraheem, B.Y. (2009). Induced Biotypes from the Fungus *Trichoderma* Types to Improve Biocontrol and Enhancement Plant Growth Parameters. Ph.D. Thesis. College of Agriculture and Forestry, Mosul Univ., Iraq (In Arabic with English abstract).

Jayalakshmi, S.K; S. Raju; S. Usha Rani; V.I. Benagi and K. Sreeramulu (2009). *Trichoderma harzianum* L_1 as potential source for lytic enzymes and elicitor of defense responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against with disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cieeri*. Australian J. of Crop Sci. 3: 44-52.

Kato, M. and S. Shimizu (1987). Chlorophyll metabolism in higher plants.VII. cholorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. Can. J. Bot. 65:729-735.

Kullnig, C; R.L. Mach; M. Lorito and C.H.P. Kubicek (2000). Enzyme diffusion from *Trichoderma atrovivide* (=*T.harzianum* P1) to *Rhizoctiona soloni* is aprerequisite for triggering of *Trichoderma ech42*gen expression before mycoparasitic contact. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2232-2234.

Leclere V; M. Bechet; A. Adam; J.S. Guez; B. Wathelet; M. Ongena; P. Thonart; F. Gancel; M. Chollet-Imbert and P. Jacques (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. Appl. Environ. Microbial., 71: 5477-4584.

Monte, E. (2001). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. Int. microbiol. 4: 1-4.

Randall, J.M. and M. Tu (2003). Biological Control. In: Tu *et al*. (eds.) Weed Control Methods Handbook, the Nature Conservancy. pp.1-24

Rifai, M.A.(1969). A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological papers,116: 1-56.

Samuels, G.J. (2004). *Trichoderma* in biologicalcontrol: a Taxonomist. Biocontrol News and infor. 25: 1-6.

Schirmböck M; M. Lorito; Y.L. Wang; C.K. Hayes; I. Arisan-Atac; F. Scala; G. Harman; C. Kubicek (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. Appl. Environ. Mocrobiol. 60:4364-4370.

Shi, C.; Y. Dai; X. Xu; Y. Xie and Q. Liu (2002).The purification of polyphenol oxidase from tobacco .Protein Experiment and Purification 24:51-55.

Summerell, B.A; B. salleh and J.F. Leslie (2003). Aultititarian approach to *Fusarium* identification. P;ant Dis. 87: 117-128.

Vey, A; R.E. Hoagland and T.M. Butt (2001). Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt T.M., C. Jackson, N. Magan (eds) Fungi as biocontrol agents: Progress, Problems and Potential. CAB Internation Bristol, pp.311-346.

Zieslin, N. and R.Ben-Zaken (1993). Peroxidase activity and presence of phenolic substrate in peduncles of rose flower. plant Physio.Biochem.31:333-339.