طرز حيوية جديدة من الفطر *Trichoderma* spp. كفوءة في استحثاث مقاومة نباتات الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* ضد الفطر *Rhizoctonia solani*

خالد حسن طه بسام يحيى إبراهيم
قسم وقاية النبات / كلية الزراعة والغابات/جامعة الموصل

الخلاصة

أظهرت النتائج قدرة عزلات المقاوم الحيوي *Trichoderma* spp في خفض نسبة وشدة إصابة نباتات الفاصوليا بالفطر *R. solani* وتفوقت العزلة ThK20 على بقية العزلات اذ بلغت نسبة الإصابة ٢٣ % وشدة الإصابة ٠.٢٧ في نباتات الفاصوليا المعاملة بها ، تلتها العزلة ThK80 إذ بلغت نسبة الإصابة ٣٢ % وشدة الإصابة ٠.٣٤وبينت النتائج قدرة العزلات ThK20 وThK80 وTh1 *T.viride* في استحثاث المقاومة ضد الفطر *R.solani* إذ تفوقت العزلة Thk20 معنويا على بقية العزلات في زيادة فعالية انزيم بيروكسديز إذ بلغت فعالية الإنزيم ١٨.٣ /دقيقة/غم وزن رطب تلتها العزلتان Th1 و*T.viride* (١١.٤٨ و ٨.٤٥ /دقيقة/غم وزن رطب على التوالي) من خلال زيادة فعالية الإنزيمات و تفوقت العزلتان Th1 وThk20 معنويا عن بقية العزلات في زيادة فعالية إنزيم بولي فينول اوكسديز إذ بلغت فعالية الإنزيم في النباتات المعاملة بها ٠.٢٦٥ و٠.١٨٩/دقيقة/غم وزن رطب على التوالي. و تفوقت العزلة *T.viride* معنويا على بقية العزلات في زيادة فعالية إنزيم كاتاليز و بلغت فعالية الإنزيم١٣.٨٥/دقيقة/غم وزن رطب تلتها العزلتان Thk20 و Th1 إذ بلغت فعالية الإنزيم بوجودهما ١٢.٨١ و٩.٥٤ /دقيقة/غم وزن رطب على التوالي . تم تعريض العزلة ThK20 إلى الأشعة فوق البنفسجية فأمكن الحصول على طفرات جديدة منها وبعد اختبار الطرز المستحصل عليها من حيث كفاءتها في المكافحة الحيوية اتضح أن الطرز N7 و N8 و N9 و N10 و N15و N16 وN22 قد حققت أعلى خفض معنوي في نسبة الإصابة ولكنها لم تختلف عن العزلة الأبوية Thk20 وتفوق الطراز N8 على بقية الطرز والعزلة الأبوية في خفض شدة الإصابة حيث بلغت ٠.٤ وأظهرت النتائج قدرة الطرزN8 وN9 و N15 و N22 في استحثاث المقاومة ضد الفطر *R. solani* من خلال زيادة فعالية الإنزيمات بيروكسديز و بولي فينول اوكسديز و كاتاليز إذ تفوق الطراز N22 على العزلة الابوية في فعالية انزيم بيروكسديز اذ بلغت الفعالية ١٥.٨٤ /دقيقة/غم وزن رطب وفي العزلة الابوية ٩.٥٩ /دقيقة/غم وزن رطب وفي فعالية انزيم بولي فينول اوكسديز اذ بلغت الفعالية ٠.٢١٣ /دقيقة/غم وزن رطب وفي العزلة الابوية ٠.١٠٨ /دقيقة/غم وزن رطب في حين تفوق الطراز N15 على العزلة الابوية في فعالية انزيم كاتاليز اذ بلغت الفعالية ١٤.٤٩ /دقيقة/غم وزن رطب وفي العزلة الابوية ٧.٣٥ /دقيقة/غم وزن رطب

المقدمة

في غضون السنوات الأخيرة انصب الاهتمام على دور الفطر*Trichoderma* sp. في استحثاث المقاومة في النبات كونه واحداً من المفاتيح الرئيسة للمكافحة الإحيائية والمتمم للآليات الأخرى والتي تتضمن التطفل والتضاد والمنافسة (Djonovic،٢٠٠٥) إذ أدت معاملة نباتات الخيار بابواغ الفطر *T. harzianum* بطريقة رش المجموع الخضري أو معاملة التربة في خفض شدة الإصابة بالفطر *B. cinerea* والى زيادة محتوى الجدران الخلوية من السيليلوز وكذلك من مستوى إنزيمي Peroxidase وChitinase في أنسجة الجذور والأوراق(Wooوآخرون١٩٩٩) وزيادة فعالية إنزيماتChitinase و β-1,3-Glucanase و Cellulase و Peroxidase في النباتات المعاملة بالفطر *Trichoderma* spp. مقارنة بالنباتات غير المعاملة (Yedidiaوآخرون٢٠٠٠) وأدت معاملة بذور القطن بالفطر *T. virens* و*Trichoderma* spp. إلى زيادة محتوى الجذور من إنزيم Peroxidase مقارنة بجذور النباتات غير المعاملة (Howellوآخرون٢٠٠٠وحميد٢٠٠٢). وتعد إنزيمات بيروكسيديز Peroxidase وبولي فينول اوكسديز Poly Phenol Oxidase وكاتاليز Catalaze من أهم إنزيمات الأكسدة والاختزال وقد وجد بان فعاليتها مرتبطة طرديا مع المقاومة المستحثة في العائل ضد المسببات المرضية خلال تعرضه لها

مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثاني ٢٠٠٩ .
تاريخ تسلم البحث ٩/١٥ /٢٠١٠ وقبوله ٢٠١٠/١٠/٢٧

(Karthikeyan، ٢٠٠٦) وأشار Agnese وآخرون (٢٠٠٥) الى ارتفاع مستويات الاثلين في نباتات الفاصوليا المعاملة بالفطر *T. harzianum* واقترن ذلك مع زيادة فعالية الإنزيم بيروكسيديز Peroxidase فضلاً عن دور الإنزيم بالمشاركة في تخليق اللكنين والسوبرين بعد تكثيفه للمركبات الفينولية في موقع

الإصابة كما يشارك في تحفيز إنتاج الفايتواليكسينات من خلال أكسدة الفينولات وتحويلها إلى مواد أكثر سمية للمسببات المرضية (Karthikeyan وآخرون ، ٢٠٠٦ و Hassan وآخرون ، ٢٠٠٧). ويودي هذا الإنزيم دوراً دفاعيا في النبات إذ يمنع الكائنات الحية المجهرية من مهاجمة النبات وذلك من خلال أكسدة الفينولات الطبيعية الموجودة في أنسجة النبات لإنتاج الكينونات والتي تمر بسلسلة تفاعلات بلمرة مؤدية إلى إنتاج الميلانينات Melanins التي تمتلك فعالية مضادة للكائنات الحية المجهرية (Dyakov واخرون ، ٢٠٠٧). وقد وجد أن فعالية الإنزيم مرتبطة طرديا مع المقاومة المستحثة في العائل ضد المسببات المرضية على غرار إنزيم بيروكسيديز Peroxidase وذلك عند معاملة النبات بالفطر .*Trichoderma* spp. يقوم انزيم كاتاليز Catalase في المساعدة في تفكيك بيرو كسيد الهيدروجينH_2O_2 إلى ماء وأوكسجين حر الذي له تأثير تثبيطي للمسببات المرضية فضلاً عن تفعيل آليات ASR (Clark وآخرون ، ٢٠٠٠ و Magbanua واخرون ، ٢٠٠٧) تستخدم المطفرات Mutagens بكثرة بغية إحداث تحويرات في المادة الوراثية للإحياء المجهرية التي تتمتع بأهمية في المجالات الزراعية والصناعية (الخفاجي،١٩٩٠). وتستخدم الأشعة فوق البنفسجية في إنتاج طفرات وطرز من .*Trichoderma* spp ذات قدرة جيدة في إنتاج كميات أكبر من المواد الأيضية بالمقارنة مع العزلات الأبوية،وقد أشار Fauliوآخرون (١٩٩٤) إلى زيادة كفاءة الفطرين *T. harzianum* و *T.viride* في إنتاج المضاد الحيويIsocynide وهو مضاد حيوي جديد لم تكن تنتجه العزلات الأبوية،ويعود ذلك إلى أن العديد من العزلات الأبوية تمتلك قدرة كامنة في إنتاج العديد من المواد الايضية يمكن استثمارها لإنتاج المضادات الحيوية بعد تعريضها للأشعة فوق البنفسجية. وأشار Hao وآخرون (٢٠٠٦) إلى إمكانية إنتاج طفرات من الفطر *T. reesei* تمتلك القدرة في إنتاج إنزيم السليلوليز بمقدارأعلى (١.٧٥ مرة) مقارنة بالعزلات الأبوية بعد تعريضها للأشعة فوق البنفسجية . واستخدمت الأشعة فوق البنفسجية في تطوير القدرة التضادية للفطر *Trichoderma* ضد الفطر*Pyrenochaeta lycopersici* المسبب لمرض الجذر الفليني Corky Rootفي الطماطة فضلاً عن زيادة المقدرة الاستيطانية في التربة وتحمل الأوساط القاعدية والحرارة المنخفضة (Besoain وآخرون ، ٢٠٠٧).

مواد البحث وطرائقه

الفطر الممرض : تم الحصول على عزلة من الفطر *Rhizoctonia solani* من قسم وقاية النبات / كلية الزراعة والغابات /جامعة الموصل وهي عزلة ممرضة لنبات الفاصوليا.

عزلات عامل المكافحة الإحيائية: استخدم في البحث عزلات الفطر .*Trichoderma* spp الآتية :

١- العزلتين Thk20 و Thk80 وهما عزلتان مطفرتان من الفطر *T. harzianum* تم الحصول عليها من د. خالد حسن طه / قسم وقاية النبات / كلية الزراعة والغابات.

٢- العزلات Th_1 و Th2 و Th3 و و Th4 و Th5 وهي عزلات محلية من الفطر *T. harzianum* تم عزلها من جذور الفاصوليا وجذور النارنج وجذور نبات الباقلاء وجذور نبات اللوبيا و جذور الفلفل على التوالي ، وتم تعريف العزلات السابقة تبعا للمفتاح التصنفي المعد من قبل Ranasingh واخرون (٢٠٠٦).

٣- العزلة Tv من الفطر*T. viride* عزلة مصرية / المركز القومي للأبحاث / جمهورية مصر العربية. تم الحصول عليها من د. عصام محمد سليمان /كلية التربية / جامعة الموصل.

اختبار حيوية عزلات عامل المكافحة الاحيائية : تمت تهيئة البيت البلاستيكي التابع لقسم وقاية النبات /كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل ونفذت فيه المعاملات الآتية والتي استخدمت فيها جميع الطرز الحيوية للعزلةThK20 فضلاً عن العزلة الأبوية ThK20بشكل مستقل .

١- زراعة بذور فاصوليا معاملة بالطرز الحيوية و العزلة الأبوية ThK20 في تربة معقمة.

٢- زراعة بذور فاصوليا معاملة بالطرز الحيوية و العزلة الأبوية ThK20 في تربة ملوثة بالفطر الممرض *R.solani*

٣- زراعة بذور فاصوليا غير معاملة بالطرز الحيوية والعزلة الأبويةThK20في تربة ملوثة بالفطر الممرض*R.solani* (المقارنة)

٤- زراعة بذور فاصوليا غير معاملة بالطرز الحيوية و العزلة الأبوية ThK20 في تربة معقمة (مقارنة سلبية)

لوثت التربة المعقمة بالفطر الممرض *R.solani* بواقع ٣ غم كتلة حيوية/كغم تربة (Lo وآخرون ، ١٩٩٨). عوملت بذور الفاصوليا بمعلق ابواغ طرزعامل المكافحة الإحيائية*Trichoderma* .spp بتركيز ٤×١٠^{٦} بوغ /مل مع إضافة المولاس بتركيز ٥% كمادة لاصقة وقاعدة غذائية (Aziz وآخرون ، ١٩٩٧) وبعد ثلاثة أيام من معاملة التربة بالفطر الممرض زرعت بذور الفاصوليا وبواقع خمس بذور لكل أصيص وخمسة مكررات لكل عزلة. تم حساب النسبة المئوية للإصابة بموت البادرات قبل وبعد البزوغ بعد أسبوعين وأربعة أسابيع من الزراعة. وبعد ٤ أسابيع تم حساب شدة الإصابة وفق الدليل المرضي المعدل والمعد من قبل Krause وآخرون (٢٠٠١) .

استحثاث المقاومة : أجري الاختبار باستخدام أطباق البولي ستايريرن بأبعاد ٦٥ ×٤٠× ٦ سم يحتوي الطبق على ٩٦ حجرة زراعة مملوءة بخليط من البتموس والزميج المعقم بنسبة ١:١. وعوملت بذور الفاصوليا بمعلق طرز عزلات المقاوم الحيوي *Trichoderma* spp. بتركيز ٤× ١٠ ^٦ بوغ/مل من المعلق مع إضافة المولاس بتركيز ٥% كمادة لاصقة (Aziz وآخرون ، ١٩٩٧) زرعت البذور بواقع بذرة واحدة في كل حجرة، ثم قلعت البادرات بعد مرور ١٠ أيام من الزراعة .وأخذ ١ غم من جذور بادرات كل معاملة بعد تنظيفها بالماء الجاري.ثم سحقت الجذور مع٢مل من دارىء الفوسفات ذي الأس الهيدروجيني٧ في هاون خزفي(Howell وآخرون ٢٠٠٠) وحفظت في أنابيب اختبار سعة ١٠ مل ثم خضعت الأنابيب الحاوية على خليط أنسجة الجذور والمحلول الدارىء إلى عملية انتباذ بسرعة٣٠٠٠ دورة/دقيقة وحفظ الراشح في درجة صفر سيليزية لحين قياس فعالية الإنزيمات .

تقدير فعالية انزيم بيروكسيديز: تم قياس فعالية إنزيم بيروكسيديز باختبار كوايكول Guaiacol (Howell وآخرون ، ٢٠٠٠).

تقدير فعالية الإنزيم بولي فينول اوكسيديز باختبار كاتيكول Catechole (Shi وآخرون ، ٢٠٠٢) وتم **تقدير فعالية انزيم كتاليز** :بطريقة Kato و Shimizu (١٩٨٧) .

الحصول على طرز حيوية جديدة: تم استخدام العزلة ThK20 كعزلة أبوية لغرض الحصول على طرز حيوية جديدة منها إذ تمت عملية تعريض ابواغ الفطر للأشعة فوق البنفسجية تبعاً لطريقة Besoain وآخرون (٢٠٠٧)

اختبار حيوية الطرز الجديدة : تمت تهيئة البيت البلاستيكي التابع لقسم وقاية النبات /كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل ونفذت فيه المعاملات الآتية والتي استخدمت فيها جميع الطرز الحيوية للعزلةThK20 فضلاً عن العزلة الأبوية ThK20بشكل مستقل .

١- زراعة بذور فاصوليا معاملة بالطرز الحيوية و العزلة الأبوية ThK20 في تربة معقمة.

٢- زراعة بذور فاصوليا معاملة بالطرز الحيوية و العزلة الأبوية ThK20 في تربة ملوثة بالفطر الممرض. *R.solani*

٣- زراعة بذور فاصوليا غير معاملة بالطرز الحيوية و العزلة الأبوية ThK20 في تربة ملوثة بالفطر الممرض*R.solani* (المقارنة)

٤- زراعة بذور فاصوليا غير معاملة بالطرز الحيوية و العزلة الأبوية ThK20 في تربة معقمة (مقارنة سلبية) .

وعقمت التربة وعوملت بذور الفاصوليا بمعلق ابواغ الطرز الحيوية والعزلةThK20 كما ذكر سابقاً. . تم حساب النسبة المئوية للإصابة بموت البادرات قبل وبعد البزوغ بعد أسبوعين وأربعة أسابيع من الزراعة. وبعد ٤ أسابيع تم حساب شدة الإصابة وفق الدليل المرضي المعدل والمعد من قبل Krause وآخرون (٢٠٠١).

قدرة الطرز الاحيائية الجديدة على استحثاث المقاومة :لغرض تحديد قدرة الطرز الاحيائية الجديدة على استحثاث المقاومة مقارنة بالعزلة الابوية تم تقدير فعالية فعالية انزيمات بيروكسيديز و بولي فينول اوكسيديز وكتاليز كما ذكر سابقاً.

النتائج والمناقشة

اختبار القدرة الامراضية : اظهر اختبار القدرة الإمراضية بعد أسبوعين من الزراعة موت معظم بادرات الفاصوليا قبل بزوغها و لوحظ عند الكشف عن البذور إنها كانت إما متعفنة أو كان نموها ضعيفاً مع تقرح السويقة الجنينية وتلونها باللون البني أو البني المحمر مما حال دون بزوغها فوق سطح التربة (Mandova وآخرون ، ١٩٨٠ وOgoshi ، ١٩٩٦).. وتميزت الأعراض بعد أربعة أسابيع من الزراعة بهيئة تقرحات بنية محمرة غائرة أحيانا في الجذور ومنطقة الساق القريبة من سطح التربة للنباتات المصابة غير الميتة وتتسع البقع لتحث تحلقاً بالساق Girdling ويعزى ذلك إلى قدرة الفطر *R.solani* في إفراز الإنزيمات المحللة للسليوليز والبكتين التي تؤدي إلى تعفن البذور وموت البادرات وتقرح الجذور (Weinhold وSinsclair ،١٩٩٦) فضلاً عن قدرة الفطر في إفراز بعض المركبات السامة للنبات Phytotoxin مثل Phenyl Acetic Acid (PAA) ومشتقاته الهيدروكسيلية نوعي آلفا وبيتا التي تتسبب في قتل أجنة البذور.

النسبة المئوية للإصابة وشدة الإصابة : أظهرت عزلات عامل المكافحة الإحيائية.*Trichoderma* spp المستخدمة كفاءة في خفض النسبة المئوية للإصابة بمرض موت البادرات المتسبب عن الفطر *R.solani* (الجدول ١) إذ تفوقت العزلةThk20 في خفض نسبة الإصابة بموت البادرات (٢٣%) تلتها العزلة Thk80(٣٢ %) تلتهما بقية العزلات والتي اختلفت جميعها معنويا عن معاملة المقارنة التي بلغت الإصابة فيها ٦٤ % . أما شدة الإصابة فقد تفوقت العزلةThk20 في خفض شدة الإصابة (٠.٢٨) تلتها العزلة Thk80 (٠.٣٤) ثم بقية العزلات أما معاملة المقارنة فقد بلغت شدة الإصابة فيها ٠.٦٨.

الجدول (١) : تأثير المعاملة بعزلات عامل المكافحة الإحيائية *Trichoderma* spp. في نسب وشدة إصابة الفاصوليا بالفطر *Rhizoctonia solani* .

عزلة عامل المكافحة الإحيائية	%* للإصابة	شدة الإصابة*
المقارنة	٦٤ أ	٠.٦٨ أ
Thk20	٢٣ ز	٠.٢٨ ز
Thk80	٣٢ و	٠.٣٤ و
Th1	٤٨ج	٠.٣٩ هـ
Th2	٥٢ب	٠.٤٩ ب
Th3	٤٤ د	٠.٤٣ ج
Th4	٤٨ ج	٠.٤٢ ج د
Th5	٤٨ ج	٠.٤٠د هـ
T.viride	٣٦ هـ	٠.٤١ ج هـ
المقارنة السلبية	صفر ح	٠.٢٠ح

*المتوسطات المتبوعة بحروف متشابهة لاتختلف معنويا حسب اختبار دنكن المتعدد المدى ولمستوى احتمال ٥%.

وتتفق النتائج مع الدراسات السابقة الخاصة بالعزلتين Thk20وThk80 والتي أشارت إلى قدرتهما التطفلية والتضادية والتنافسية العالية ضد مجموعة من مسببات أمراض موت البادرات وتعفن الجذور والذبول الوعائي بضمنها الفطر *R.solani* (طه ،١٩٩٠ ول- مراد ،٢٠٠٢ واللشي ،٢٠٠٣)، كذلك النتائج التي حققتها العزلة *T.viride* المشار إليها من قبل اللشي (٢٠٠٣) بخصوص كفاءتها في خفض نسبة وشدة الإصابة بالفطريات المسببة لتعفن جذور السمسم . وأشار Barakat وآخرون (٢٠٠٧) إلى كفاءة العزلات المحلية من الفطر *Trichoderma* spp. في خفض نسب إصابة الفاصوليا بالفطر *R.solani* إلى ٣٥.٥ % كما ذكر Woo وآخرون (١٩٩٩) أن استخدام الفطر *Trichoderma* spp. في معاملة بذور الفاصوليا قد خفض نسبة الإصابة بالفطر *R.solani* من ٧٥.٥ % إلى ١٣.٥ % .كما أشار Abd-El-Kareem (٢٠٠٧) أن معاملة بذور الفاصوليا بأبواغ الفطر *T. harzianum* أدت إلى خفض نسبة الإصابة بالفطر *R.solani* .

استحثاث المقاومة:

تقدير فعالية الإنزيم بيروكسيديز Peroxidase: تبين النتائج في الجدول (٢) قدرة عزلات عامل المكافحة الإحيائية.*Trichoderma* spp في استحثاث المقاومة في نباتات الفاصوليا من خلال رفع فعالية الإنزيم بيروكسيديز Peroxidase إذ تفوقت العزلة Thk20 معنويا على بقية العزلات،وبلغت فعالية الإنزيم ١٨.٣ /دقيقة/غم وزن رطب تلتها العزلتان Th1 و*T.viride* (١١.٤٨ و ٨.٤٥ /دقيقة/غم وزن رطب على التوالي) ثم العزلة Thk80 ثم العزلة Th2 بفارق معنوي عن معاملة المقارنةإذ بلغت فعالية الإنزيم فيها ٣.١٨ /دقيقة/غم وزن رطب. أما العزلتان Th3 و Th4 فلم تختلف معنويا عن المقارنة . وكانت العزلة Th5 مثبطة لفعالية الإنزيم (١.٧٨ /دقيقة/غم وزن رطب) ومن ثم ضعفت كفاءتها الحيوية في هذا الجانب .

تقدير فعالية الإنزيم بولي فينول اوكسيديز Polyphenoloxidase: تبين النتائج في الجدول (٢) قدرة عزلات عامل المكافحة الإحيائية. *Trichoderma* spp في رفع فعالية الإنزيم بولي فينول اوكسيديز Polyphenoloxidase إذ تفوقت العزلتان Th1 وThk20 معنويا عن بقية العزلات إذ بلغت فعالية الإنزيم في النباتات المعاملة بها ٠.٢٦٥ و٠.١٨٩/دقيقة/غم وزن رطب على التوالي. تلتها العزلات Th2 و *T.viride* و Thk80 إذ بلغت فعالية الإنزيم٠.١٨٤و ٠.١٧٨ و٠.١٦٦ /دقيقة/غم وزن رطب على التوالي ثم Th3 في حين لم تتسبب العزلة Th4 في إحداث زيادة في فعالية الإنزيم بولي فينول اوكسيديز إذ لم تختلف معنويا عن معاملة المقارنة إذ بلغت فعالية الإنزيم فيها ٠.١١٦ /دقيقة/غم وزن رطب, كما تسببت العزلة Th5 في تثبيط فعالية الإنزيم ومن ثم عدم كفاءتها الحيوية في هذا الجانب.

تقدير فعالية إنزيم كتاليز Catalase: وتبين النتائج في الجدول (٢) قدرة عزلات عامل المكافحة الإحيائية.*Trichoderma* spp في رفع فعالية الإنزيم كتاليز Catalase إذ تفوقت العزلة *T.viride* معنويا على بقية العزلات و بلغت فعالية الإنزيم١٣.٨٥/دقيقة/غم وزن رطب تلتها العزلتان Thk20 و Th1 إذ بلغت فعالية الإنزيم بوجودهما ١٢.٨١ و٩.٥٤ /دقيقة/غم وزن رطب على التوالي ، تلتهما العزلة Th2 ثم العزلتين Th4 وTh5 وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة إذ بلغت فعالية الإنزيم فيها ١.٧٦ /دقيقة/غم وزن رطب ، أما العزلة Th3 فقد كانت مثبطة للإنزيم كتاليز ومن ثم عدم كفاءتها الحيوية

في هذا الجانب. إن هذه النتائج توضح العلاقة الوثيقة بين رفع فعالية تلك الإنزيمات والمقاومة المستحثة والذي انعكس على نسبة الإصابة بالفطر *Rhizoctonia solani* (الجدول ١،) .

الجدول (٢) : تأثير عزلات الفطر *Trichoderma* spp. في فعالية بعض الإنزيمات لبادرات نبات الفاصوليا .

عزلة عامل المكافحة الإحيائية	فعالية الإنزيم /دقيقة/غم وزن رطب		
	* بيروكسديز	* بولي فينول اوكسديز	* كتاليز
مقارنة	٣.١٨ هـ	٠.١١٦ هـ	١.٧٦ هـ
ThK20	١٨.٣٠أ	٠.١٨٩أب	١٢.٨١ب
ThK80	٥.٣٤ ج	٠.١٦٦ ب ج	٣.٨١ د
Th1	١١.٤٨ب	٠.٢٦٥ أ	٩.٥٤ ب
Th2	٤.٠٢ د	٠.١٨٤ب	٧.٦٨ ج
Th3	٣.٨١ د هـ	٠.١٤٤ ج د	٠.٩٦٦ و
Th4	٣.٤٧ د هـ	٠.١٢٣ د هـ	٤.٣٥ د
Th5	١.٧٨ و	٠.٠٩٣ و	٤.١٥ د
T.viride	٨.٤٥ب ج	٠.١٧٨ ب ج	١٣.٨٥ أ

*المتوسطات التي تحمل حروفا متشابهة لاتختلف معنويا حسب اختبار دنكن المتعدد المدى ولمستوى حتمل 0%.

اختبار حيوية الطرز الجديدة لعامل المكافحة الاحيائية:

النسبة المئوية للإصابة وشدة الإصابة : أظهرت طرز عزلة عامل المكافحة الإحيائيةThk20 تبايناً في كفاءتها في خفض نسبة الإصابة بمرض موت البادرات المتسبب عن الفطر *R.solani* (الجدول،٣) إذ بلغت أدنى نسبة للإصابة في الطرز N3 و N6 و N7 و N8 و N9 و N10 و N11 و N12 و N13 و N15و N16 و N19 وN22 وN25 وN26 والتي لم تختلف عن العزلة الأبوية Thk20 في حين كانت الطرز N1و N2و N4و N5و N14و N17و N18و N20و N24و N27و N28 اقل كفاءة في خفض نسبة الإصابة من العزلة الأبوية Thk20. ولاسيما الطرازان N16و N18 . وتميزت الطرز N7 و N8 و N9 و N11 في خفض شدة الإصابة مقارنة بالعزلة الأبوية Thk20 كما ارتفعت شدة الإصابة بوجود الطرز N6 و N14 و N17 و N18 إذ تقاربت فيها شدة الإصابة مع شدة الإصابة في نباتات المقارنة أما بقية الطرز فقد تقاربت في تأثيرها مع العزلة الأبوية Thk20. وأشارت الدراسات إلى تفوق بعض من طرز الفطر *Trichoderma* spp. على عزلاتها الأبوية في مقدار خفضها لشدة الإصابة ونسبة الإصابة إذ خفض الطرازان *T. virens* Tkvk133 و *T. virenss* Tvk24 من نسبة إصابة نباتات القطن بالفطر *P. ultimum* إلى ٢٠ و٣٠ % على التوالي مقارنة بنسبة الإصابة ٧٠% في العزلة الأبوية *T. virens* وشدة الإصابة بالفطر *R. solani* إلى ٠.٢٥ و٠.٢٨ مقارنة بشدة الإصابة ٠.٤٥ في العزلة الأبوية *T.virens* (Mendoza وآخرون ٢٠٠٣). ويبدو من ذلك إن التغيير الوراثي الحاصل في المادة الوراثية نتيجة لاستخدام الأشعة فوق البنفسجية UV شمل الجين أو الجينات المؤثرة في الكفاءة الحيوية ضد الممرض وان هذا التغيير تسبب في إضعاف أو تنشيط كيموحيوية الطرز وأحيانا إبقائها في نفس المستوى من الكفاءة. وأشارت العديد من الدراسات إلى حدوث تغيرات كيموحيوية في الطرز كقدرتها في زيادة إنتاج الإنزيمات التي تستحث المقاومة مثل إنزيم السليوليز أو زيادة إنتاج المواد ذات القدرة التثبيطية للممرض (Baek وآخرون ١٩٩٩ و Nevalainen وآخرون ٢٠٠١ وBesoain وآخرون٢٠٠٧).

الجدول (٣) : تأثير المعاملة بطرز عزلة عامل المكافحة الإحيائية*Trichoderma harzianum* k20 في نسب وشدة إصابة نباتات الفاصوليا بالفطر *Rhizoctonia solani* .

** طرز عامل المكافحة الإحيائيةThk20	* %للإصابة	* شدة الإصابة
المقارنة	٤٤ ب ج	٠.٦٢ أ
Thk20(العزلة الأبوية)	٢٤ وز	٠.٤٧ ج و
ThK20N1	٣٦ج هـ	٠.٥٢ ب د
ThK20N2	٣٦ج هـ	٠.٥١ ب د
ThK20N3	٢٤ وز	٠.٤٨ ب و
ThK20N4	٣٦ج هـ	٠.٥١ ب د
ThK20N5	٣٦ج هـ	٠.٤٩ ب و

ThK20N6	٢٤ وز	٠.٥٦ أ ب
ThK20N7	٢٠ ز	٠.٤٣ وز
ThK20N8	٢٠ ز	٠.٤٠ ز
ThK20N9	٢٠ ز	٠.٤٣ وز
ThK20N10	٢٠ ز	٠.٥٢ ب د
ThK20N11	٢٤ وز	٠.٤٢ وز
ThK20N12	٢٤ وز	٠.٤٧ ج و
ThK20N13	٢٤ وز	٠.٤٨ ب و
ThK20N14	٤٠ ب د	٠.٥٦ أ ب
ThK20N15	٢٠ ز	٠.٤٥ د ح
ThK20N16	٢٠ ز	٠.٥٢ ب د
ThK20N17	٤٨ أ ب	٠.٥٦ أ ب
ThK20N18	٥٦ أ	٠.٦٣ أ
ThK20N19	٢٠ ز	٠.٤٤ هـ ز
ThK20N20	٣٦ ج هـ	٠.٤٩ ب و
ThK20N21	٤٠ ب د	٠.٥٢ ب د
ThK20N22	٢٠ز	٠.٤٧ ج و
ThK20N23	٣٢ د و	٠.٥٤ ب ج
ThK20N24	٤٠ ب د	٠.٥٢ ب د
ThK20N25	٢٤ وز	٠.٤٨ ب و
ThK20N26	٢٨ هـ ز	٠.٤٩ ب و
ThK20N27	٤٠ ب د	٠.٥٢ ب د
ThK20N28	٣٦ ج هـ	٠.٤٤ هـ ز
المقارنة السلبية	صفر ح	٠.٢٠ ط

*المتوسطات التي تحمل حروفا متشابهة لاتختلف معنويا حسب اختبار دنكن المتعدد المدى ولمستوى احتمال ٥%

** N1 –N28 رمزا لطرز الناتجة عن تعريض أبواغ العزلة ThK20 للأشعة فوق البنفسجية .

قدرة الطرز الإحيائية الجديدة على استحثاث المقاومة

تقدير فعالية الإنزيم بيروكسيديز: تبين النتائج في الجدول (٤) تفوق الطرز N8 و N9 وN15 وN16 و N22 معنويا على العزلة الأبوية في فعالية الإنزيم بيروكسيديز إذ بلغت ١٠.٨٨ و ١٢.١ و ١٥.٨٦و١١.١٢ و١٥.٨٤ /دقيقة /غم وزن رطب على التوالي في حين بلغت الفعالية ٩.٥٩ / دقيقة /غم وزن رطب في العزلة الأبوية وبلغت ٦.١٨ /دقيقة /غم وزن رطب في معاملة المقارنة .

تقدير فعالية الإنزيم بولي فينول اوكسيديز:تبين النتائج في الجدول(٤)تفوق الطرازان N16 و N22 معنويا على العزلة الأبوية في فعالية الإنزيم بولي فينول اوكسيديز اذ بلغت ٠.١٦٣ و ٠.٢١٣ /دقيقة /غم وزن رطب على التوالي في حين بلغت الفعالية ٠.١٤٤/ دقيقة /غم وزن رطب في العزلة الأبوية وبلغت ٠.١٠٨ /دقيقة /غم وزن رطب في معاملة المقارنة .

تقدير فعالية الإنزيم كتاليز:تبين النتائج في الجدول (٤) أن الطراز N15 هو الطراز الوحيد من بين جميع الطرز الذي لم يختلف معنويا عن العزلة الأبوية في فعالية الإنزيم كتاليز فقد بلغت ١٤.٤٩ /دقيقة /غم وزن رطب في حين بلغت الفعالية ١٤.٧٧ دقيقة /غم وزن رطب في العزلة الأبوية في حين اخفقت بقية الطرز اخفقت في التفوق معنوياً على العزلة الأبوية رغم تفوق بعضها معنويا على معاملة المقارنة والتي بلغت فيها الفعالية ٧.٣٥ / دقيقة /غم وزن رطب .

ومما سبق فقد أمكن الحصول على طرز حيوية متفوقة في تنشيطها لفعالية بعض الإنزيمات المرتبطة باستحثاث المقاومة كالطراز N22 الفعال في زيادة فعالية الإنزيمين بيروكسيديز و بولي فينول اوكسيديز مما ساهم في خفض نسبة الإصابة في النباتات المعاملة بهذا الطراز، أما الطرازان N8 وN9 فقد كانا كفوءان

في زيادة فعالية الإنزيم بيروكسيديز وانعكس ذلك في خفض نسبة وشدة الإصابة بالمرض فضلا عن الطراز N15 إذ ساهم في خفض نسبة الإصابة بالمرض .

ووجد Steinite وآخرون (٢٠٠٤) وGailite وآخرون (٢٠٠٥). وأدت معاملة نباتات الفاصوليا بالفطر *T.viride* إلى زيادة مستوى فعالية إنزيمي بيروكسيديز Peroxidase بنسبة ١٧٥% وبولي فينول اوكسيديز Polyphenoloxidase بنسبة ١٦٨% وأدت معاملة التربة بالفطر *T.viride* إلى زيادة مستوى فعالية إنزيمي بيروكسيديز Peroxidase وبولي فينول اوكسيديزPolyphenoloxidase في جذور نباتات جوز الهند وفستق الحقل بعد ثلاثة أيام من المعاملة فضلا عن زيادة مستويات المواد الفينولية (Karthikeyan وآخرون ٢٠٠٦) . وكان لمعاملة بذور القطن بعزلات الفطر *Trichoderma* spp. الأثر الواضح في رفع مستوى الإنزيم بيروكسيديز Peroxidase (حميد ،٢٠٠٢) .وأشارت الدراسات إلى اقتران الفعالية العالية لهذه الإنزيمات مع مستوى عال من المقاومة في النبات إذ يعمل الإنزيم بيروكسيديز مع بيروكسيد الهدروجين في تكسير الإنزيمات التي ينتجها المسبب المرض ومنها إنزيمات بكتنيز Pectinase ومن ثم تثبيط عملية تحطيم الجدار الخلوي .وتعمل نواتج تحطم إنزيمات بكتنيز كإشارات استحثاثية في النبات استجابة للإجهاد الحيوي المتمثل بوجود المسببات المرضية ومن ثم إطلاق آلية الاستحثاث التتابعي للعديد من الوسائل الدفاعية الكيمائية ومنها بناء المركبات الدفاعية المستحثة Phytoalexins وذلك في مساري حامض الشيكميك Shikimic acid وحامض الميفالونيك Mevalonic acid فضلا عن الدفاعات التركيبية لتقوية الجدران مثل بناء اللكنين كما يتفاعل الإنزيم مع بعض بروتينات الجدار الخلوي لتكوين روابط عرضية ومركبات متعددة مما يزيد من صلابة الجدار الخلوي (Breusegem Van،٢٠٠١وHibar وآخرون ٢٠٠٧) تؤدي زيادة المحتوى من المواد الفينولية كاستجابة أولية لغزو المسببات للنبات إلى زيادة فعالية الإنزيمين بيروكسيديز Peroxidase وبولي فينول اوكسيديز Polyphenoloxidase اللذان يؤكسدان الفينولات. إذ يعمل الإنزيم بيروكسيديز Peroxidase على أكسدة الفينول وO-dihydroxyphenol ويعمل الإنزيم وبولي فينول اوكسيديز Polyphenoloxidase على أكسدة الكاتيكول . إن الإلية التي تستحث بها عزلات عامل المكافحة الإحيائية.*Trichoderma* spp زيادة مستوى فعالية هذه الإنزيمات تأتي من دور إنزيمات التحلل المائي التي ينتجها الفطر ومنها إنزيمي السليوليز Cellulase وزايلنيزXylaunase إذ تستحث هذه الإنزيمات تكوين مركبات Oilgogalctoroides في جدار الخلية النباتية وتعمل هذه المركبات في استحثاث آليات المقاومة في الخلية النباتية ومنها زيادة مستوى فعالية إنزيمات الأكسدة التي تحد من تطور الإصابة. أما الآلية الأخرى فان إنزيمي سليوليز Cellulase و زايلنيز Xylaunase يستحثان تكوين الاثلين فضلا عن إنتاج عامل المكافحة الإحيائيةللاثلين وهو بدوره يعمل على زيادة مستوى الإنزيم بيروكسيديز Peroxidase (حميد ،٢٠٠٢ و Steinite وآخرون ٢٠٠٤).يأتي دور الإنزيم كتاليز Catalase في استحثاث المقاومة من خلال تفكيك بيروكسيد الهدروجين إلى ماء وأوكسجين حر والأخير يعد احد مركبات Active Oxygen Species AOS والذي يعمل في إطلاق آلية فرط تفاعل الحساسية HSR Hyper Sensitive reaction وموت الخلية وهذا الموت يفعل آليات المقاومة الجهازية المكتسبة SAR Systemic Acquired Resistance في جميع خلايا النبات (Wu وآخرون ١٩٩٥) .

الجدول (٤) : تأثير طرز عامل المكافحة الإحيائية k20 *Trichoderma harzianum* في الفعالية الانزيمة لبادرات نبات الفاصوليا .

طرز عامل المكافحة الإحيائيةThK20	فعالية الإنزيم /دقيقة /غم وزن رطب		
	*بيروكسيديز	*بولي فينول اوكسيديز	*كتاليز
المقارنة	٦.١٨٠ ز	٠.١٠٨ هـ	٧.٣٥٠ هـ
Thk20(العزلة الأبوية)	٩.٥٩٠ د	٠.١٤٤ج	١٤.٧٧٠ أ
ThK20N1	١.٣٥٠ ن م	٠.٠٥١ ك	٨.٧٧٠ د
ThK20N2	٩.٤١٠ د	٠.١٢٧ د	٤.٧٥٠ ل م
ThK20N3	١.٠٣٠ ن م	٠.٠٢٩ ل	١.٧١٠ ل م
ThK20N4	٨.٠٢٠ هـ	٠.١٠٩ هـ	٠.٧٦٠ ن
ThK20N5	٨.٠٨٠ هـ	٠.٠٢٢ ل م	٨.٦١٠د

ThK20N6	٤.٩٨٠ وط	٠.٠١١ ن	٧.٣٩٠ هـ
ThK20N7	٠.٨٤٠ ن	٠.٠١٨ م ن	١.٢٤٠ م ن
ThK20N8	١٠.٨٨٠ ج	٠.١٥١ ج	١٠.٢٨٠ ج
ThK20N9	١٢.١٠٠ ب	٠.١٥٠ ج	٩.٩٥٠ ج
ThK20N10	١١.٢٤٠ ج	٠.١٤٦ ج	٩.٨٣٠ ج
ThK20N11	٧.٩١٠ هـ	٠.٠١٠٨ هـ	٧.٣٣٠ هـ
ThK20N12	٧.٦٦٠ هـ	٠.٠٥٧ ي ك	٤.٥٦٠ ح ط
ThK20N13	٤.٣٧ ط ك	٠.٠٥٩ ط ك	١.٢٤٠ م ن
ThK20N14	٤.٢٦٠ ي ك	٠.٠١٤ م ن	٠.٩٤٠ م ن
ThK20N15	١٥.٨٦٠ أ	٠.١٢٩ د	١٤.٤٩٠ أ
ThK20N16	١١.١٢٠ ج	٠.١٦٣ ب	١١.٠٧٠ ب
ThK20N17	٧.٨٧٠ هـ	٠.١٠٦ هـ	٧.٢٤٠ هـ
ThK20N18	٦.٨٦٠ و	٠.٠٩ و	٧.٢٠٠ هـ
ThK20N19	٣.٧١٠ ك	٠.٠٥٩ ط ك	٥.١١٠ ز ح
ThK20N20	٦.١٥٠ ز	٠.٠٨٢ ز	٤.٥٦٠ ح ط
ThK20N21	٢.٢٠٠ ل م	٠.٠٦٧ ح ط	٣.٣٩٠ ك
ThK20N22	١٥.٨٤٠ أ	٠.٢١٣ أ	١٠.١٧٠ ج
ThK20N23	١.٦٦٠ ل م	٠.٠٢ م ن	٤.٥١٠ ح ي
ThK20N24	٥.٥٩٠ ل م	٠.١٠٦ هـ	٣.٩٠٠ ي ك
ThK20N25	٥.١٩٠ ح	٠.٠٧٥ ز ح	٤.٠٤٠ ط ك
ThK20N26	٤.٩٣٠ ح ي	٠.٠٧٠ ح	٥.٦٥٠ ز
ThK20N27	١.٥١٠ ن م	٠.٠٦٦ ح ي	٦.٣٠ و
ThK20N28	١٠.٧٥٠ ج د	٠.٠١٠٣ هـ	٧.٠١٠ هـ

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

NEW BIOTYPES OF *TRICHODERMA* SPP EFFECTIVE IN INDUCING RESISTANCE ACTIVATION AGAINST *Rhzioctonia solani* CASUAL AGENT IN BEAN PLANTS *Phaseolus vulgaris*.

Kahld Hassan Taha Bassam Yahya Ibraheem
Dept. of Plant Protection, College of Agric and Forestry. Univ. of Mosul .Iraq

ABSTRACT

The results showed that application of the bioagents *Trichoderma* spp. isolates as a conidial suspension greatly reduced the percentage of disease and the disease index caused by *R. solani* in bean plants at different rates. The most effective *Trichoderma* spp. isolates were Thk20 Thk80 which reduced disease percentage to 23% and Thk80 32% and disease index to 0.27 and 0.34 respectively. The results indicate that isolates Thk20,Thk80,Th1 and *T.viride* have a strong tendency to induce resistance against *R.solan*.The isolate Thk 20 differed significantly and caused significant raising in Peroxidase activity 18.3 /min/g f.w follow that the isolates Th1 and *T.viride* 11.48 and 8.45 /min/g f.w .Thk20 and Th1 isolates differed significantly and caused significant raising Poly Phenol Oxidase activity with 0.265 and 0.189 /min/g f.w while the isolate *T.viride* caused significant raising in Catalaze activity with 13.85/min/g f.w, following that the

isolates Thk20 and Th1 with 12.81 and 9.45/min/g f.w respectively . Thk20 spores were exposed to UV aiming a new biotypes which were segregate by its ability to grow on CM medium The new biotypes were tested for their efficiency as bio-control agents and as a plant growth promoter. The results showed that biotypes N7,N8,N9,N10,N15,N16 and N22 caused significant reduction in disease percentage but showed no significant differences with parent isolate Thk20. The biotype N8 succeeded in reducing the disease index to 0.4 .The results Strongly suggest that biotypes N8,N9,N15, and N22 have a propensity to induce resistance against *R. solani* which is reflected in significant increase of Peroxidase, Poly Phenol Oxidase and Catalaze activity.

المصادر

حميد ، فاخر رحيم (٢٠٠٢). دراسة كفاءة عزلات من الفطر *Trichoderma* spp. في استحداث المقاومة ضد الفطر *Rhzioctonia solani* في أربعة أصناف من القطن . رسالة ماجستير ،كلية الزراعة , جامعة بغداد ،٧٩ صفحة .

الخفاجي ، زهرة محمود (١٩٩٠). التقنية الحيوية .مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر ، ٨٨٩ صفحة.

طه ، خالد حسن(١٩٩٠) . المقاومة المتكاملة لمرض ذبول الخضروات الوعائي المتسبب عن *Verticillium dahia* kleb . أطروحة دكتوراه ،كلية الزراعة , جامعة بغداد ،١٩٢صفحة.

اللشي ، نجوى بشير شمعون (٢٠٠٣). المقاومة المتكاملة لبعض أمراض جذور السمسم الفطرية في محافظة نينوى . أطروحة دكتوراه ،،كلية الزراعة والغابات , جامعة الموصل ،١٥١صفحة.

المراد ، نهال يونس محمد (٢٠٠٢). دراسة مرض تعفن بذور وجذور بادرات الفاصوليا ومكافحته إحيائيا . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الموصل، ٩٠ صفحة .

Abd-El-Kareem ,F. (2007). Induced resistance in bean plants against root rot and alternaria leaf spot diseases using biotic and abiotic inducers under field conditions. Res. J. Agri. Biolo. Sci. 3: 767-774.

Agnese,G.; I. Samsone and G. Ievinsh (2005).Ethylene is involved in *Trichoderma*-induced resistance of bean plants against *Pseudomonas syringae* . Biology 691: 59–70.

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.

Baek, J.M.; C.R. Howell, and C.M. Kelerney (1999). The role of extracellular chitinase from *Trichoderma* virens Gv29-8 in the biocontrol of Rhizoctonia solani. Current Genetics 35:41-50.

Barakat, M. Radwan ; F. Al-Mahareeq1 ; M. S. Ali -Shtayeh and M. I. AL-Masri1(2007). Biological Control of *Rhizoctonia solani* by Indigenous *Trichoderma* spp. Isolates from Palestine . Hebron Univ. Res. J.3:1– 15.

Besoain, A. Ximena ; L. M. Perez ;A. Araya ;L. Lefever ;M. Sanguinetti and J.R. Montealegre (2007). New strains obtained after UV treatment and protoplast fusion of native *Trichoderma harzianum*: their biocontrol activity on *Pyrenochaeta lycopersici.*E.J. Bio.Tech. 10 : 664-617.

Clark ,D. ; J. Durner ; D. Navarre and D.Klessig(2000).Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbic peroxidase .MPMI.13:1380-1384.

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.

Dyakov, Yu. T. ; V. G. Dzhavakhiya and T. Korpele (2007). Comprehensive and Molecular Phytopathology Elsevier Publications. 483 pp.

Fauli , J.L. ; K.A. Gramem and B.L.Pilkington (1994).Production of an isonitrile antibiotic by UV induced mutation of *Trichoderma harzianum* .Phytochemistry 36: 1273-1276.

Gailite,A.;I.Steinite, and G. Ievinsh (2005).Ethylene is involved in *Trichoderma* induced resistance of bean plants against *Pseudomonas syringae*. Biology, 691: 59–70.

Hao, X.; X. Yu and Z.Yan (2006).Optimization of the medium for the production of cellulase by the mutant *Trichoderma reesei* WX-112 using response surface methodology .Food Technol. Biotechnol. 44 :89–94 .

Hassan, E.; M. Maggie ; Saieda S. Abd El-Rahman ; I.H. El-Abbasi and M.S. Mikhail (2007).Changes in peroxidase activity due to resistance induced against fababean chocolate spot disease. Egypt J. Phytopathol. 35: 35-48 .

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.

Karthikeyan , M.; K. Radhika ; S. Mathiyagan; R. Bhaskaran; R. Samiyappan and R.Velazhan(2006). Induction of phenolic and defense-related enzyme in coconut(*Cocos nucifera* L.) roots treated with biocontrol agent . Baz. J. Plant Physiol .18:367-377.

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.

Krause, M. S.; V. Laurence and A.J. Harry (2001). Effect of potting mix microbial carrying capacity on biological control of *Rhizoctonia* damping-off of radish and Rizoctonia crown and root rot of poinsettia. Phytopathology 91:1116-1123.

Lo, C. T.; E. B. Nelsson ; C. K. Hayes and G. E. Harman(1998). Ecological studies of transformed *T.harzianum* strain 1295 – 22 in the rhizosphere and on Phyl–Loplane of creeping bentgrass. Phytopathology 88: 129 – 136.

Magbanua ,Z.; C. Moraes ;T.Brooks ; W.Williams and D.Luthe (2007). Is catalase activity one of the factores associated with maize resistance to *Aspergillus flavus* . MPMI 20:697-706.

Mandova, N. B.; R. G. Orellana; J. D. Warther ; J. E. Werely ; S. R. Duthy ; H. Finegerd and B. C. Weathington (1980). Phtotoxins in *Rhizoctonia solani*: Isolation and biological activity of M. hydroxy and M. methoxy Phenylacetic acid. J. Agric. Food Chem.28:71 –75.

Mendoza-Mendoza, A.; M.J. Pozo ; D. Grzegorski ; P. Martinez; J.M.Garcia ; V. Olmedo-Monfil, C. Cortes; C. Kenerley and A. Herrera-Estrella (2003). Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma* throughinactivation of a mitogen-activated protein kinase. Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A. 100:15965-15970.

Nevalainen, K.M.H.; E.T. Palva, and M.J. Bailey (2001). Ahigh cellulase producing mutant strain of *Trichoderma reesei*. Enzyme and Microbial.Technology 2:59-60.

Ogoshi, A. (1996). Introduction. The Genus Rhizoctonia 1 – 9 pp. (C. F. snech, B., Hare, H. J., Neak, E. F. and Gijse, J. 1996). *Rhizoctonia* species : Taxanomy, Mollecular

Biology, Ecology, Pathology and disease control, Kluwer Aceademic Pulishers Printed in Netherlands . 585pp.

Ranasingh, N. ; A. Saurabh and M. Nedunchezhiyan (2006). Use of *Trichoderma* in Disease Management . Orissa Review septemper–October -2006.3pp.

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.

Steinite, I.; A. Gailite and G. Ievinsh (2004). Reactive oxygen and ethylene are involved in the regulation of regurgitant-induced responses in bean plants. J. Plant Physiol. 161:191–196.

Van Breusegem, F.; E. Varnova; L .F. Dat and D. Inze (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. Plant Sci. 161: 405-414.

Weinhold, A. S.;J. Sinsclair (1996). *Rhizoctonia solani* : peneteration, colonization and host response.P. 163–174.

Woo, S. E.; B. DonzelliScala ; F. Mach ; G. E. Harman ; C. P. Kubicek ; G. Delsorboand and M. Lorito (1999). Disruption of ech 42 (endochitinase encoding) gene affect biocontrol activity in *Trichoderma harzianum*. PI. Mol. Plant Microbe. Interact. 12: 419- 429.

Wu,G. B . ; J. Shortt ; B. Ellen ; B. Lawrence, Elaine ; C. Levine ; Karen C. Fitzsimmons and Dilip M. Shah (1995).Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H202-generating glucose oxidase in transgenic potato plants . The Plant Cell 7: 1357-1368.

Yedidia, N.; I. Benhamou ;Y. Kapulnik and I. Chet (2000). Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. Plant Physiol. Biochem. 38: 863-873.