اختبار التضاد الفطري بين الفطرين الاحيائيين ***Trichoderma harzianum*** و ***T.*viride** وبعض الفطريات الصائدة للنيماتود على الاوساط الصلبة

أ.د. علي عبد الواحد قاسم

الموبايل : 07703200419

الايميل : alimycol@uomisan.edu.iq

أنفال عبد الرزاق لفتة الرحيماوي

قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة ميسان

الخلاصة Abstract

تم اختبار القدرة التضادية بين الفطرين الأحيائيين *Trichoderma harzianum* و*T. viride* مع سبعة أنواع من الفطريات الصائدة للنيماتود (*Arthrobotrys oligospora* و *A.conoides* و *A.eudermata* و *A.thaumasia* و *A.microcaphoides* و *A.cookedichison* و *Clonostachys rosea*) على الوسطين وسط بطاطا – دكستروز– أكار (PDA) ووسط أكار– خلاصة الذرة (CMA). أظهرت النتائج ان الفطرين *T. harzianum* و *T. viride* يمتلكان قدرة تضادية عالية ضد الفطريات الصائدة للنيماتود المختبرة ، ووجد ان الفطر *T. harzianum* له تضاد ضد الفطريات الصائدة المختبرة أفضل من الفطر *T.viride* ، وبينت الدراسة ان الفطرين *T.harzianum*و *T.viride* لهما درجة تضاد 1، 2، 3 حسب مقياس Bell *et al*., (1982). كانت أكثر درجة تضاد هي 2 للفطرين *T. harzianum* و *T. viride* مع أغلب الفطريات المدروسة على الوسطين CMA وPDA. أظهرت النتائج انه لا يوجد اختلاف واضح في درجة التضاد عند استخدام الوسطين الزرعيين CMA وPDA عدا بعض الفطريات التي كان تضادها اختلف بين الوسطين الزرعيين. ولوحظ ان الفطر *T. harzianum* كانت درجة تضاده 1 مع الفطر *A. conoides*وعلى الوسطين CMA و PDA والفطر *A.thaumasia* على الوسط CMA، في حين ان الفطر *T.viride* اعطى نفس الدرجة مع الفطر *A.eudermata* على الوسط PDA

الكلمات المفتاحية : التضاد ، *Trichoderma harzianum* ، *T. viride* ، الفطريات الصائدة للنيماتود .

المقدمة Introduction

تعتبر الفطريات كائنات متنوعة للغاية وتلعب دورا مهما في الانظمة البيئية، فبالإضافة إلى كونها محللات decomposers فأنها تملك العديد من العلاقات مع مضائفها (Hosts) والكائنات المنافسة لها (competitors) المادة التي تنمو عليها بل حتى مع العوامل غير الأحيائية (Factors Abiotic) الموجودة في البيئة (Webster 1995 & Dix). بعض هذه العلاقات قد تكون مفيدة للأحياء

(Interactions Mutualistic)، في حين ان البعض الاخر تكون محددة لنمو أحد الاحياء على الأقل (Antagonistic Interactions). ومن خلال هذه العلاقات نستطيع تحديد الفطريات التي يمكن استخدامها كعامل سيطرة بايلوجية (Biological Control Agent). وان هذه العلاقات ضمن وبين المجتمعات الاحيائية تكون متعددة ومداها يمتد ما بين التأزر وتبادل المنفعة إلى التضاد والتطفل (Klepzig *et al.*, 2001 ; Waing *et al.*, 2015). ويمكن استغلال العلاقات التضادية والطفيلية في البيئة التي تحدث فيها المكافحة البيولوجية للكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض النباتية (Duffy *et al.*, 2003).

التضاد Antagonism هو فعالية أحد الكائنات الحية والتي من خلالها يؤثر سلبا على نمو كائن الاخر له علاقة به، وهذه الآلية تتضمن عدة آليات هي التضاد حيوي (Antibiosis) والتنافس (Competition) والاستغلال (Exploitation) (Khara & Hadwan, 2008) تشير الدراسات إلى أن مثل هذه الظواهر البيئية تؤدي إلى اكتشاف فطريات لها قابلة على إنتاج مواد ايضية جديدة فعالة بيولوجيا Gloer, 1995))

تمتاز الاحياء المستعملة في السيطرة البايلوجية بامتلاكها قدرة تضادية عالية واليات متنوعة ضد المسببات المرضية إضافة الى قدرتها على تشجيع نمو النبات وتتميز بسهولة عزلها من بيئتها وسرعة نموها وإمكانية تنميتها على أوساط غذائية رخيصة الثمن (Harman, 2000) ولها القدرة على البقاء لفترة طويلة وتنتج ابواغ كلاميدية تتحمل الظروف البيئية غير المناسبة وكذلك قدرة هذه الكائنات المستعملة في المكافحة على تكرار نشاطها ضد العديد من المسببات المرضية (مولان واخرون، 2005).

من المعروف ان الفطر *Trichoderma* يمتلك قابلية تضادية ضد الكثير من الأحياء المستوطنة في التربة وتشمل الفطريات واللافقريات والبكتيريا (Verma *et al.*, 2007) ولذلك فهو من عوامل السيطرة البايلوجية والذي يستخدم بكفاءة ضد الكثير من الممرضات النباتية (Suresh and Nelson, 2015)، وان استخدامه في هذا المجال لا يؤثر سلبا على الإنسان والبيئة (kader, 2008). أشار Askary (2015) إلى ان الفطريات المهلكة للنيماتود من الفطريات الشائعة في التربة وتمتلك الكثير من العلاقات البيئية مع بقية الاحياء المستوطنة في التربة. هذه الفطريات لها القابلية في إصابة النيماتود سواء كانت هذه النيماتود حرة المعيشة أو متطفلة على النبات وبالتالي يمكن اعتبارها كأحد عوامل السيطرة البايلوجية (Herrera-Estrella *et al.*, 2016).

واحدة من اهم مشاكل تقدير السيطرة البيولوجية عند استخدام عامل سيطر واحد (Biocontrol agent (BCA) (فطري أو بكتيري) هو انها غالبا ما تكون غير كفؤة اتجاه النيماتود، وان فعالية السيطرة البيولوجية تزداد عند مزج عوامل سيطرة متعددة Biocontrol agents (BCAs) ، وان مزج هذه العوامل أو نواتجها من المحتمل تعطي انواع واسعة من تأثيرات السيطرة البيولوجية وتحت مدى واسع من الظروف البيئية (Szabó *et al.*, 2012 ; Lafta and Kasim, 2019). لذلك عندما يراد استخدام الفطر *Trichoderma* spp. والفطريات الصائدة للنيماتود سوية في السيطرة البايلوجية يجب معرفة القدرة التضادية لهما وكيف يؤثر أحدهما على الاخر. فارتئينا إجراء هذا البحث من اجل التثبت فيما كان احدهما لا يثبط أو يثبط نمو الاخر وبالتالي إمكانية أو عدم إمكانية استخدامهما سوية في السيطرة البايلوجية.

المواد وطرق العمل Material and methods

الأوساط الزرعية Culture media

استخدم الوسطين الزرعيين التاليين

- وسط أكار- خلاصة الذرة (CMA Corn Meal Agar) والذي استخدم لتنمية مزارع نقية (Pure Cultures) للفطريات الصائدة للنيماتود وحضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة.
- وسط بطاطا – دكستروز- أكار (PDA Potato Dextrose Agar) والذي استخدم الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* وحضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة

اختبار التضاد بين الفطرين الإحيائيين *T.harzianum* و *T.viride* والفطريات الصائدة للنيماتود

تم الحصول على الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* من قبل ا. م. د. ضياء سالم الوائلي (قسم وقاية نبات – كلية الزراعة – جامعة البصرة)، ولغرض تحديد القابلية التضاديه بين هذين الفطرين الإحيائيين وسبعة أنواع من الفطريات الصائدة للنيماتود (*Arthrobotrys oligospora* و *A.conoides* و *A.eudermata* و *A.thaumasia* و *A.microcaphoides* و *A.cookedichison* و *Clonostachys rosea*) ، تم الحصول عليها من مختبر الفطريات – قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة ميسان، استعملت طريقة الزرع المزدوج ، واستخدم الوسطين الزرعية PDA و CMA (كلا على حدا) ، قسم طبق بتري حاوي احد الوسطين إلى قسمين متساويين ثم لقح مركز القسم الأول من الطبق بقرص 0.5 سم اخذ بالقرب من حافة مستعمرة حديثه لأحد الفطرين *T.harzianum* او *T. viride* بعمر 4 أيام ولقح القسم الثاني بقرص مماثل من مستعمرة فتية لاحد الفطريات الصائدة للنيماتود وبعمر 7 ايام ، كما أضيفت معاملة مقارنة استخدم فيها الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* وذلك بتلقيح مركز الطبق الذي يحتوي على الوسط (PDA و CMA) المعقم . نفذت التجربة بثلاث مكررات لكل معاملة وحضنت الأطباق تحت درجة حرارة 25 مْ. وحسبت درجة التضاد بعد وصول نمو مستعمرة الفطر الأول في معاملة السيطرة إلى حافة الطبق وفق مقياس Bell *et al*., (1982) المكون من خمس درجات.

- الفطر الأول يغطي كل الطبق بما فيه الفطر الثاني.
- الفطر الأول يغطي ثلثي الطبق.
- الفطر الأول يغطي نصف الطبق.
- الفطر الثاني يغطي ثلثي الطبق.
- الفطر الثاني يغطي كل الطبق.

ويعد الفطر الأول فعالاً إذا كانت درجة التضاد أصغر او يساوي 2.

بما ان أفضل وسط لنمو الفطريات الصائدة للنيماتود CMA وان وسط PDA هو الوسط الملائم لنمو الفطرين *T.harzianum* و*T.viride* لذا ارتأينا ان نستخدم كلا الوسطين في إجراء هذه التجربة .

النتائج Results

أظهرت نتائج اختبار التضاد بين جميع الفطريات المدروسة ان الفطرين *T.harzianum* و*T.viride* لهما قدرة تضادية واضحة ضد أنواع الفطريات الصائدة للنيماتود المختبرة ، ولوحظ من خلال الفحص بالمجهر الضوئي لمناطق التضاد انه لا يوجد تثبيط بينها أي أن الخيوط الفطرية للفطرين *T.harzianum.* و *T.viride* والفطريات الصائدة للنيماتود المختبرة لا تفرز مواد محلله للخيوط الفطرية لها ، ولم يلاحظ أي تطفل فطري بين هذه الفطريات ، ولوحظ أيضا ان الفطر *T.harzianum* له تضاد ضد الفطريات الصائدة المختبرة أفضل من الفطر *T.viride* ، وبينت الدراسة ان الفطرين *T.harzianum*و *T.viride* لهما درجة تضاد (1، 2، 3)، حسب مقياس Bell *et al*., (1982). كانت اكثر درجة تضاد هي 2 الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* مع أغلب الفطريات المدروسة على الوسطين CMA وPDA (جدول 1).

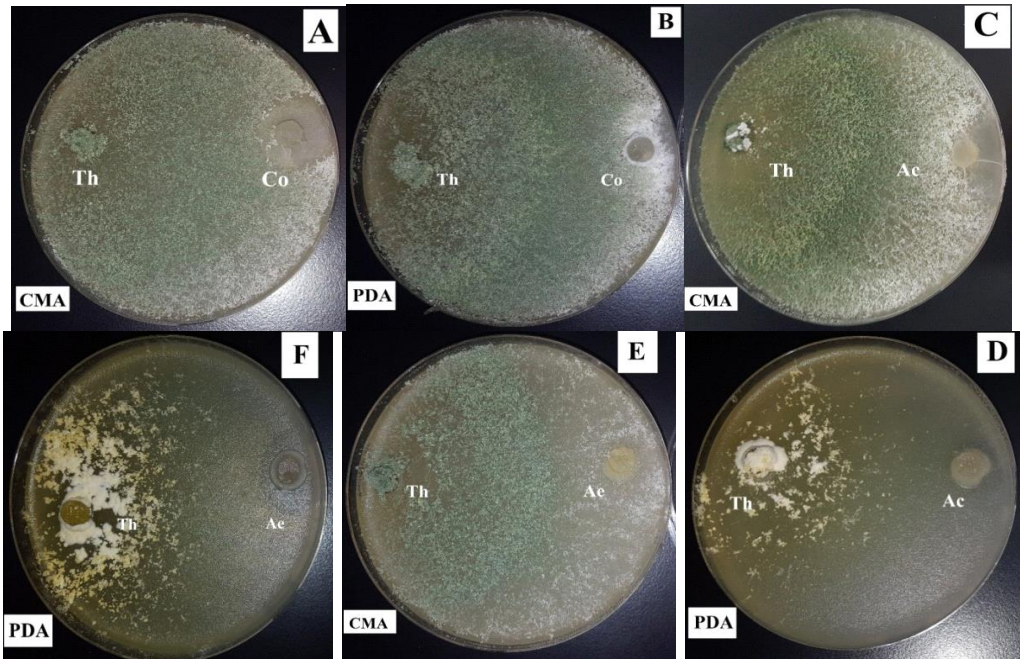
بينت الدراسة ان الفطر *T.harzianum* كانت درجة تضاده 1 مع الفطر *A.conoides*وعلى الوسطين CMA و PDA (شكل 1 Aو B) والفطر *A.thaumasia* على الوسط CMA (شكل 2 E) ، ولوحظ ان الفطر *T.viride* كانت درجة تضاده 1 مع الفطر *A.eudermata* على الوسط PDA (شكل 1 B).

جدول (1) يوضح درجة التضاد بين الفطرين *T.harzianum* و *T.virid* والفطريات الصائدة للنيماتود المدروسة

على الوسطين الزرعيين CMA وPDA حسب مقياس Bell *et al*., (1982).

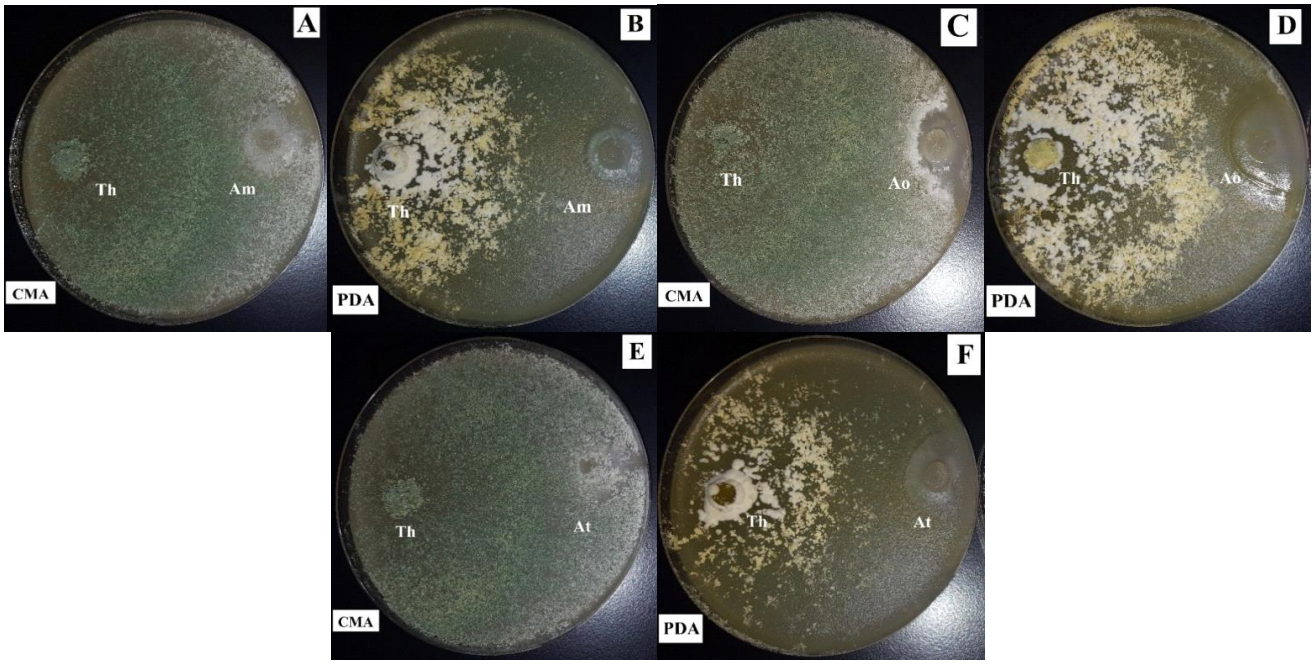
الفطريات الصائدة للنيماتود	*T.harzianum*		*T.viride*	
	CMA	PDA	CMA	PDA
A conoides	1	1	2	2
A.cookedichison	2	3	2	2
A.eudermata	2	2	2	1
A.microscaphoides	2	3	2	2
A.oligospora	2	2	2	2
A.thaumasia	1	2	3	2
C.rosea	2	2	3	2

وبلغت درجة التضاد 3 بين الفطر *T.harzianum* والفطريات *A.cookedichison*(شكل D1) و *A.microscaphoides* (شكل B 2) و *C.rosea* (شكل B 3) على الوسطPDA ، بينما اعطى الفطر *T.viride* درجة تضاده 3 مع الفطر *A.thaumasia*على الوسط CMA (شكل A 5). ويوضح جدول 1 ان درجة تضاد الفطر *T.harzianum* مع الفطرين *A.eudermata* و *A.oligospora* بلغت 2 على الوسطين CMA و PDA ، من جهة أخرى بينت الدراسة ان درجة تضاد الفطر *T.viride* بلغت 2 مع خمسة من الفطريات الصائدة للنيماتود على الوسطين CMA و PDA .

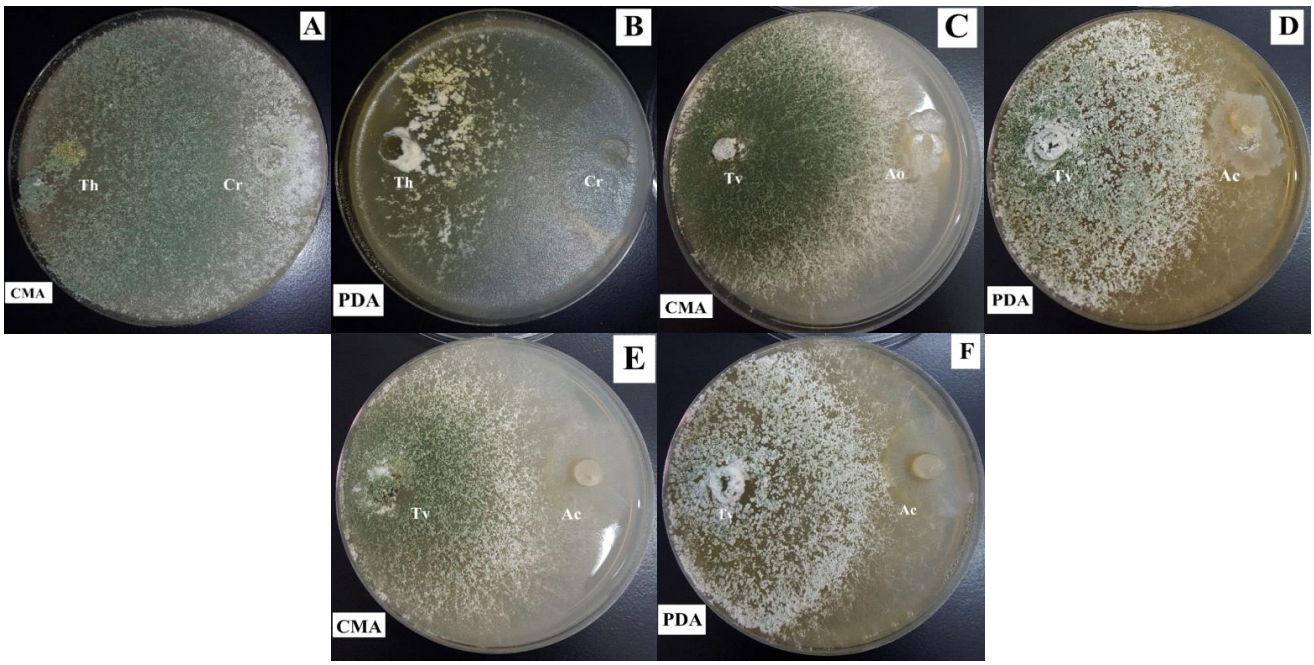


شكل (1) التضاد بين الفطرين *T.harzianum* والفطريات الصائدة للنيماتود على الوسطين CMA و PDA **، ضد الفطر *A.conoides* A و B ، ضد الفطر *A.cookedichison* C و D**، ضد الفطر ***A.eudermata* E و F.**

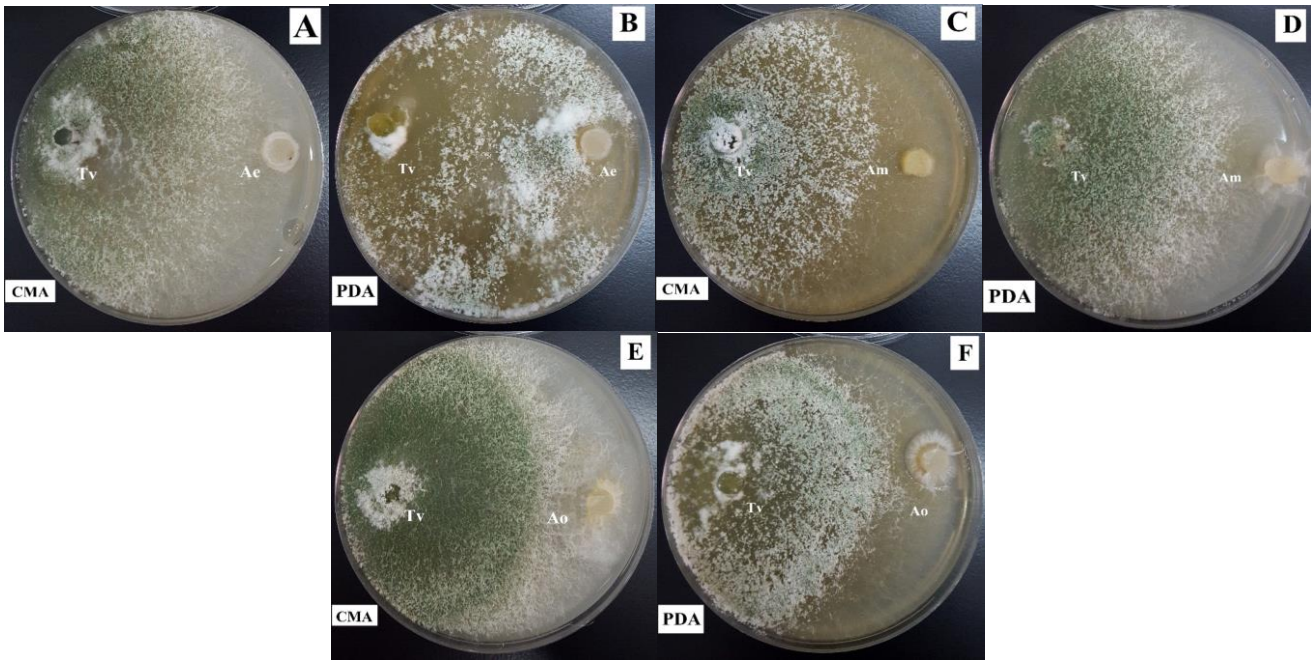
أظهرت النتائج انه لا يوجد اختلاف واضح بين الوسطين الزرعيين CMA و PDA عند دراسة تأثير التضاد بين الفطرين *T.harzianum* و *T*.viride والفطريات الصائدة للنيماتود المدروسة ماعدا الفطر *A.eudermata* كانت درجة تضاده 1 على الوسط PDA وأصبحت 2 على الوسط CMA (شكل 5 Cو D) وكذلك الفطر *A.thaumasia* كانت درجة تضاده 2 على الوسط PDA وأصبحت 3 على الوسط CMA (شكل 6 Aو B) مع الفطر *T*.viride ، أما الفطر *A.thaumasia* مع الفطر*T.harzianum* كانت درجة تضاده 2 على الوسط PDA وأصبحت 1 على الوسط CMA (شكل 1 Eو F).



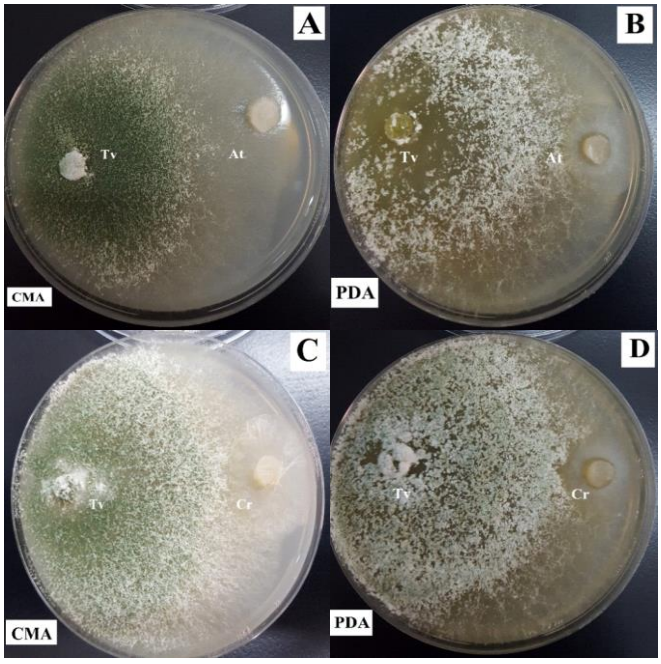
شكل (2) التضاد بين الفطرين *T.harzianum* والفطريات الصائدة للنيماتود على الوسطين CMA و PDA**، ضد الفطر *A.microscaphoides* A و B ، ضد الفطر *A.oligospora* C و D،** ضد الفطر **_A.thaumasia_ E و F**



شكل (3) التضاد بين الفطر *T.harzianum* ضد الفطر *C.rosea* A و B ، الفطر *T.viride* ضد الفطر *A.conoides* C و D، الفطر *T.viride* ضد الفطر *A.cookedichison* E و F.



شكل (4) التضاد بين الفطرين *T.viride* والفطريات الصائدة للنيماتود على الوسطين CMA وPDA، ضد الفطر *A.eudermata* A وB ، ضد الفطر *A.microscaphoides* C وD، ضد الفطر *A.oligospora* E وF



شكل (5) التضاد بين الفطرين *T.viride* والفطريات الصائدة للنيماتود على الوسطين CMA وPDA، ضد الفطر *A.thaumasia* A وB ، ضد الفطر *C.rosea* C وD

المناقشة Discussion

اشارت الدراسات ان الفطر *Trichoderma* يعمل ضد الفطريات الممرضة اما بصورة غير مباشرة عن طريق التنافس على المغذيات او المكان او يحفز نمو النبات او ميكانيكيات الدفاع او افراز مواد ضد حيوية Antibiosis او يؤثر بصورة مباشرة من خلال بعض الميكانيكيات مثل التطفل الفطري (Reino *et al*., 2008 ; Bhardwaj and Kumar,2017). وأشار Vinale *et al*. (2008) إلى ان الفطر *T.harzianum* يستخدم ثلاث ميكانيكيات للتضاد وهي التطفل الفطري – الفطري (Mycoparasitism) والتضاد الحيوي (Antibiosis) والتنافس (Competition).

واشار الساعدي (2011) ان الفطر *Trichoderma* يتصف بسهولة عزلة وسرعة نموه ولا يحتاج الى متطلبات غذائية خاصة، بحيث ينمو خلال 4 أيام او اقل. بينما الفطريات الصائدة للنيماتود تحتاج الى فتره 7 أيام او أكثر وقد تصل إلى أكثر من 10 أيام كما في الفطر *Drechslerella brochopaga* (قاسم، 1997). في هذه الدراسة وجد ان الفطر *Trichoderma* والفطريات الصائدة للنيماتود لا يوجد تطفل وافراز مواد تحلل الخيوط الفطرية لكل منها على الاخر، وقد يفرز مواد ايضية مختلفة لكنها لا تحطم الخيوط الفطرية.

ذكر Szabó, *et al*. (2014) انه من خلال دراسته للتضاد الفطري بين عزلات عديدة لأنواع الفطر *Trichoderma* spp. وبعض الفطريات الصائدة للنيماتود مثل الفطر *Monacrosporium cionobagum* انه وبعد 3 أسابيع من الحضن لم تستطع عزلات الفطر *T.harzianum* ان تمر او تحتل منطقة الفطر *M.cionobagum* ولم يلاحظ أي التفاف حول خيوطه الفطرية من قبل خيوط عزلات الفطر *T.harzianum* أي لا يوجد تطفل فطري Microparasitism ولوحظ أيضا ان خيوط الفطر *T.harzianum* نادراً ما نمت فوق خيوط الفطريات الصائدة ولوحظ كذلك انه يوجد تماس قليل بين عزلات الفطر *T.harzianum* والفطريات الصائدة للنيماتود.

وأشار Patkowska *et al*. (2015) إلى ان الفطرين *T.harzianum* و *C.rosea* يمتلكان قدرة تضادية عالية ضد الفطريات الأخرى ، ولكن الفطر *T.harzianum* يمتلك قدرة تضادية عالية مقارنتة ببقية الفطريات حيث استطاع تثبيط نمو ثلاث أنواع من الفطريات المحللة للاخشاب وبنسبة 100% (Lee *et al*., 2012). بينما أشار الباحثين Suresh and Nelson (2016) إلى ان الفطرين *T.harzianum* و ***T.viride*** لهما قدرة تضادية عالية ضد سبعة من فطريات التربة.

المصادر References

الساعدي، احمد مشاري ذاري. 2011. إمكانية تصنيع مستحضر احيائي من الفطر *Trichoderma viride* وتطبيقه في المكافحة الاحيائية لمرض ذبول وتعقد جذور البطيخ المتسبب عن الفطر *Fusarium oxysporum f.sp.melonis* والنيماتود *Meloidogyne* spp.، رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة البصرة.

قاسم، علي عبدالواحد. 1997. دراسة حول الفطريات المهلكة للنيماتود في تربة جنوب العراق. رسالة ماجستير، جامعة البصرة، 101.

Bhardwaj, N. R. and J. Kumar . 2017. Characterization of volatile secondary metabolites from *Trichoderma asperellum* .J. Appl & .Nat. Sci. 9 (2): 954 - 959.

Dong, L. Q., and Zhang, K. Q. (2006). Microbial control of plant-parasitic nematodes: A five-party interaction. *Plant and Soil, 288,* 31–45.

Gouveia, S. A., F. E. F. Soares, T. Morgan, B. L. Sufiate, G. P. Tavares, and F. R. Braga. 2017. "Enhanced Production of *Monacrosporium thaumasium* Protease and Destruction Action on Root-Knot Nematode Meloidogyne Javanica Eggs." *Rhizosphere* 3 (P1): 13–15. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.12.001.

Dix NJ, Webster J. 1995 – Fungal ecology. London. Chapman & Hall.

Duffy B, Schouten A, Raaijmakers JM. 2003 – Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. Annual Review of Phytopathology 41, 501–538, Doi:10.1146/annurev. phyto.41.052002.095606.

Harman, G. E. 2000. "Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perception Derived from Research on Trichoderma Harzianum T-22." *Plant Disease* 84: 377–393.

Herrera-estrella, A., and S. Casas-flores. 2016. "Nematophagous Fungi." In *Environmental and Microbial Relationships*, edited by I.S. Druzhinina and C.P. Kubicek, 3rd Editio, 247–67. Switzerland: Springer International.

kader, M. A. Al. 2008. "In Vitro Studies on Nematode Interactions with Their Antagonistic Fungi in the Rhizosphere of Various Plants." Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Germany.

Klepzig, K. D., Moser, J. C., Lombardero, M. J., Ayres, M. P., Hofstetter, R. W. and Walkinshaw, C. J. 2001. Mutualism and Antagonism: Ecological Interactions Among Bark Beetles, Mites and Fungi. *Biotic Interactions in Plant-Pathogen Associations* (eds M.J. Jeger and NJ. Spence) p.237-267.

Lafta, Anfal A. and Kasim, A. A. 2019. Effect of Nematode-trapping fungi, *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas fluorescens* in controlling Meloidogyne spp. Plant Archives. 19 (1) : 1163-1168.

Lee, J., Huh, N., Hong, J. H., Kim, B. S., Kim, G. H. and Kim, J. J. 2012. The antagonistic properties of Trichoderma spp. inhabiting woods for potential biological control of wood-damaging fungi. Holzforschung, Vol. 66, pp. 883–887, DOI 10.1515/HF.2011.187

Patkowska1, E., Bselected ski M. 2015. Antagonistic activity ofńniak M. and KonopiźWo-ewiczżał fungi occurring in the soil after root chicory cultivation. Plant Soil Environ. Vol. 61, 2015, No. 2: .PSE-doi: 10.17221/920/2014 .59–55

Reino, J. L., R. F. Guerrero, Hernandez G. R., and I. G. Collado. 2008. "Secondary Metabolites from Species of the Biocontrol Agent Trichoderma Secondary Metabolites from Species of the Biocontrol Agent Trichoderma." *Phytochem Rev* 7: 89–123.

Suresh, N. and Nelson, R. 2016. Isolation of antagonistic fungi and evaluation of antifungal activity of the separated metabolite against the red rot of sugarcane pathogen. European Journal of Experimental Biology, 6(1): 15-21.

Szabó, M., K. Csepregi, M. Gálber, F. Virányi, and C. Fekete. 2012. "Control Plant-Parasitic Nematodes with Trichoderma Species and Nematode-Trapping Fungi: The Role of Chi18-5 and Chi18-12 Genes in Nematode Egg-Parasitism." *Biological Control* 63 (2): 121–28.

Verma. M., Brar, S. K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. and Val´ero, J.R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal 37.1–20.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M.,2008. Trichoderma–plant–pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry 40, 1–10.

Waing KGD, Abella EA, Kalaw SP, Waing FP, Galvez CT 2015 – Antagonistic interactions among different species of leaf litter fungi of Central Luzon State University. Plant Pathology & Quarantine 5(2), 122–130, Doi 10.5943/ppq/5/2/9

Antagonism between *Trichoderma* harzianum, *T.viride* and some species of the nematode fungi on solid media

Ali A. Kasim Anfal A. Lafta

Biology department/College of Science/University of Misan

Corresponding author: Ali A. Kasim; E-mail address: alimycol@yahoo.com

Abstract

The antagonism between *Trichoderma harzianum*, *T.viride* and seven species of nematode trapping fungi (*Arthrobotrys oligospora, A.conoides, A.udermata, A.thaumasia, A.microcaphoides, A.cookedichison* and *Clonostachys rosea*) were evaluated on solid media (potato dextrose agar (PDA) and Corn Meal Agar (CMA)). The results showed that *T.harzianum* and *T.viride* revealed a high antagonism capacity against the tested nematode trapping fungi. It was found that *T.rhizianum* showed the highest antagonism ability comparing with *T.viride*. both species gave antagonism degrees 1, 2, 3 according to the Bell *et al.* (1982), and 2 antagonism degree was the most apparent on both CMA and PDA media. The results showed that there was no significant difference in the degree of antagonism when using CMA and PDA except for some of the fungi that had a difference between the two media. It was noted that the *T.harzianum* had 1 antagonism degree with *A.conoides* fungi and on the CMA and PDA and *A.thaumasia* fungi on the CMA, while the T.viride gave the same degree with *A.eudermata* on the PDA.

Keywords: **Antagonism,** *Trichoderma harzianum, T. viride,* Nematode-Trapping Fungi.