



جمهورية العراق  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة ميسان / كلية العلوم  
قسم علوم الحياة

عزل وتصنيف الفطريات الصائدة للنيماتود وتأثيراتها في السيطرة على بيوض  
ويرقات نيماتود العقد الجذرية *Meloidogyne sp.* وعلاقتها التضادية مع  
بعض عوامل المقاومة الحيوية

رسالة مقدمه الى مجلس كلية العلوم – جامعة ميسان جزءاً من متطلبات نيل  
شهادة الماجستير في علوم الحياة (الفطريات)

من الطالبة

انفال عبدالرزاق لفته

بكالوريوس علوم الحياة 2015

بإشراف

أ.د. علي عبد الواحد قاسم

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ  
(یَرْفَعُ اللّٰهُ الَّذِیْنَ اٰمَنُوْا مِنْكُمْ وَالَّذِیْنَ اٰتَوْا الْعِلْمَ  
دَرَجٰتٍ ۗ وَاللّٰهُ بِمَا تَعْمَلُوْنَ خَبِیْرٌ)  
صَدَقَ اللّٰهُ الْعَلِیُّ الْعَظِیْمُ

(سورة المجادلة: الآیة 11)

## توصية الأستاذ المشرف

أقر أن اعداد هذه الرسالة جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة- كلية العلوم - جامعة  
ميسان كجزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة.

التوقيع:

أسم المشرف: أ.د. علي عبد الواحد قاسم.

اللقب العلمي: أستاذ.

التاريخ: / / 2019م

## توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصية المقدمة من قبل الأستاذ المشرف أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة  
لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم: أ.م.د. زاهد سعدون عزيز.

اللقب العلمي: أستاذ مساعد.

التاريخ: / / 2019م.

## المقومون

### المقوم اللغوي

قومت الرسالة لغوياً من قبل أ.م.د. مولود محمد زايد في جامعة ميسان / كلية التربية.

### التقويم العلمي

قومت الرسالة علمياً من قبل أ.م.د. ضياء سالم علي في جامعة البصرة / كلية الزراعة.

## الاهراء

ال منغل البترية من النزل والموالاة العزة والرضوفا... النبي محمد ﷺ  
ال العين النبي تلم برؤيتي ناجحة في الحياة... ال... النبي اهدى لي سبيل عمه وعاندا لم بصبره ولم يحمر

الدهر ظهره.. والدي العزيز

ال... من علمتي بخانها كيف اجمع في بحر الهمم لتخفف الهمي... امي الغالية  
ولما ما فوق هذا وذاك، ال من تنازل في حبانة لسرف التهاوة اخني خزوفا ليمنحني لسرف الحياة  
بسمعه، لم تمهلني الدنيا لسرفي بعين الاخوة، واننت ترى جهدي علماً نافعاً. خزوفا يا جرحاً في  
ضميري.. فتساوي كلماتي في وصفك حائرة لسرفي عن ملكوتنا في ذلها. هنيئاً لسرفك الطاهرة وهي  
سرف في الجنة في حواصل طيور خضر. بكيتك ومعاً. واهديتك حرقاً صرفة جارية لسرفك  
الطاهرة امانة بعنوك كل من قرأ رسالتي.

ال إخوتي.... بحبة واحتراناً

ال من تجرع مرارة الحياة ليمنحني حلاوتها... زوجي

ال نبض قلبي وفلذة كبدي.... ابنتي

ال كل من قدح لي التصم والعوفا.... عرفانا واحتراماً

اهدي هذا الجهد

## انقال

## شكر وتقدير

الحمد لله والصلوة والسلام على أشرف أنبيائه المرسلين وعلى آله الطيبين الطاهرين وأصحابه  
المتحجبين.

لابد يعني إلهنا أنفد بخالص شكرى وتقديرى إله الأستاذ الفاضل الأستاذ الدكتور علي  
عبد الواسع قاسم الزبي وجدة أبا وأستاذاً فاضلاً الذي لم يدخل علي بأي معلومة تخص البحث.  
كما أنفد شكرى إله حماة كلية العلوم متمنة بالميد العميد أ.ب.ع. صبيح جاسم كاطع  
لرحابتها وتقديرها التسهيلات كافة لطلبة الدراسات العليا. ووافر التكر والامتنان إله رئيس قسم  
علوم الحياة أ.ب.ع. زاهد سعدون عزيز وإله جميع كادر قسم علوم الحياة والخص بالذكر الدكتور  
حميد علي مهوس والدكتور ميثع عبد الكاظم وقسم علوم الكيمياء.

كما اجبر عن شكرى واحترامى إله الأستاذ عباس جمعة سلطان وجميع العاملين في مختبر الصحة  
المركزي الذين أبدوا تعاونهم معي، كما واتكر الدكتور خصال مهدي وإخرا وكادر كلية الزراعة  
جامعة ميسان لما قدموه لي من المساعدة، واتكر الدكتور ضياء سالم (الوالدي) لتوفيره عزلات  
الفطريات والبكتريا، وللانمي فضل الدكتور لبيد السعد كلية الزراعة جامعة البصرة لما إبداه من  
تعاون في إجراء فحصات الـ DNA، كما أنفد بشكري إله دكتور اسعد يحيى لما إبداه من مساعده  
في إجراء التحليل الاحصائي. واتكر زملائي طلبة الدراسات العليا في قسم علوم الحياة، واتكر كل  
من أسهم في إنجاز هذا البحث ولو بكلمة طيبة.

## انقال

## الخلاصة

أجريت هذه الدراسة في مختبر الفطريات - قسم علوم الحياة-كلية العلوم-جامعة ميسان، تم جمع 90 عينة من ترب مناطق مختلفة من محافظة ميسان وعلى فترات زمنية مختلفة من كانون الثاني 2018 لغاية اذار 2018 وقد جمعت العينات من ترب البساتين والحقول الزراعية حيث عزل 12 نوعاً من الفطريات المهلكة للنيما تود حيث سجلت الفطريات *Clonostachys rosea*، *Arthrobotrys microscaphoides*، *Arthrobotrys cookedickinson* و *Arthrobotrys rutgeriense* للمرة الأولى في العراق.

اجري اختبار التضاد بين فطري المقاومة الحيوية *T.harzianum* و *T.viride* والفطريات الصائدة للنيما تود في الوسطين الزراعيين CMA و PDA اذ اثبتت الدراسة وجود تضاد ولكن لا يثبط احدهما الاخر اذ حقق الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* درجة تضاد 3,2,1 حسب مقياس Bell.

اظهرت النتائج ان رواشح فطري المقاومة الحيوية *T.harzianum* و *T.viride* وبتراكيز 10 و 20 و 30% من التركيز الخام أدى الى زيادة نمو الفطريات الصائدة للنيما تود في الوسط الزراعي CMA اوضحت النتائج ان اعلى تأثير كان على نمو الفطر *A.thaumasia* 85.7 ملم في حين اقل تأثير كان على الفطر *C.rosea* وبمعدل نمو 77.4 ملم وكان تأثير راشح الفطر *T.viride* على الفطريات الصائدة للنيما تود المختبرة فكان اعلى تأثير على نمو الفطر *A.cookedickison* اعلى معدل مقارنة مع بقية الفطريات حيث بلغت 85.7 ملم في حين كان اقل تأثير للفطر *A.eudermata* وبمعدل نمو 78.2 ملم وبينت النتائج ان التراكيزين 10 و 20% هما أعلى معاملات في معدل النمو وأوضحت نتائج الدراسة ان تأثير راشح الفطر *T.harzianum* على نمو الفطريات الصائدة للنيما تود المختبرة اعلى من تأثير راشح الفطر *T.viride*، وقد لوحظ ان اعداد الكونيدات تزداد بزيادة التراكيز حيث اظهر التركيز 30% اعلى زيادة في اعداد الكونيدات ويليها التركيز 20% ثم 10%.

اشارت النتائج ان راشح البكتريا *Pseudomonas fluorescens* وبتراكيز 10 و 20 و 30% أدى الى زيادة نمو الفطريات الصائدة للنيما تود في الوسط الزراعي CMA حيث كان اعلى نمو ظهر في الفطر *C. rosea* مقارنة مع بقية الفطريات حيث بلغت 87.03 ملم في حين اقل تأثير للفطر *A. thaumasia* وبمعدل نمو 83.8 ملم، وقد لوحظ ان اعداد الكونيدات تزداد

بزيادة التراكيز حيث اظهر التركيز 30% اعلى اعداد للكونيدات حيث بلغت 5382.0 كونيده/سم<sup>2</sup> ويليه التركيز 20% حيث بلغت 4453.3 كونيده/سم<sup>2</sup> ثم 10% حيث بلغت 3518.7 كونيده/سم<sup>2</sup>.

تم استخلاص الـ DNA من الفطريات الصائفة للنيماطود المدروسة حيث استخدمت في الدراسة الجزيئية باستخدام منطقة ITS1 و ITS4 ظهرت الحزم في الموقع 500bp وعملت الشجرة الوراثية لأنواع الفطريات الصائفة للنيماطود المدروسة وتتابع الاحماض الامينية باستخدام برنامج (MEGA).

أظهرت جميع الفطريات الصائفة للنيماطود المختبرة قابلية على انتاج الاجسام النانوية من خلال التغير اللوني لراشح تلك الفطريات الى اللون البني وحددت طبيعة تلك الاجسام باستخدام المجهر الالكتروني الماسح.

وجد ان استعمال مزيج من راشح الفطر *T.harzianum* وراشح البكتريا *P.fluorescens* وراشح الفطر *C.rosea* يعطي اقل معدل لفقس البيوض حيث بلغت 26.85% واعلى معدل لفقس البيوض في حال استعمال راشح الفطر *T.viride* لوحده حيث بلغت 66.21%، واعلى معدل لموت يرقات الطور الثاني في حال استعمال مزيج من راشح الفطر *T.viride* وراشح البكتريا *P.fluorescens* وراشح الفطر *A.conoides* حيث بلغت 75.46% واقل معدل لموت يرقات الطور الثاني في حال استعمال راشح الفطر *A.conoides* حيث بلغت 34.72%.



## قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
الفصل الأول-المقدمة		
1	المقدمة Introduction	1-1
2	مجاميع الفطريات المهلكة للنيما تود	2-1
3	Nematode-trapping fungi الفطريات الصائدة للنيما تود	1-2-1
4	Endonematophagous fungi الفطريات المتطفلة داخليا	2-2-1
4	الفطريات المتطفلة على البيوض والإناث	3-2-1
5	Toxin-producing fungi الفطريات المنتجة للسموم	4-2-1
5	تواجد الفطريات المهلكة للنيما تود وانتشارها	3-1
6	Mechanism of trapping ميكانيكية الاصطياد	4-1
8	استخدام طريقة التفاعل السلسلي البوليمير reaction في تصنيف الفطريات	5-1
9	قابلية الفطريات على إنتاج الجسيمات النانوية	6-1
11	الفطرين <i>Trichoderma harzianum</i> and <i>T. viride</i>	7-1
14	البكتريا <i>Pseudomonas fluorescens</i>	8-1
15	ديدان تعقد الجذور <i>Meloidogyne sp.</i>	9-1
15	السيطرة الحيوية Biological control	10-1
17	السيطرة الطبيعية Natural control	1-11-1
17	إضافة الفطريات إلى التربة Addition of fungi to soil	2-11-1
18	تحفيز التضاد الأحيائي Stimulation of resident antagonists	3-11-1
19	الهدف من الدراسة The aim of study	12-1
الفصل الثاني-المواد وطرائق العمل		
21	الأجهزة والمواد المستخدمة Instruments and material used	1-2
23	جمع العينات Sample collection	2-2
23	الأوساط الزراعية المستخدمة Culture media	3-2
23	وسط اكار- ماء (WA) Water – Agar media	1-3-2
23	وسط اكار- خلاصة الذرة (CMA) Corn Meal Agar	2-3-2
23	وسط خلاصة الذرة السائل (CMB) Corn Meal Broth	3-3-2
23	تحضير الوسط بطاطا- دكستروز- اكار (PDA) Potato Dextrose Agar	4-3-2
23	وسط بطاطا - دكستروز السائل (PDB) Potato Dextrose Broth	5-3-2
24	تحضير وسط المرق المغذي (NB) Nutrient Broth	6-3-2
24	عزل الفطريات من التربة Isolation of fungi from soil	4-2

24	فحص الفطريات وتشخيصها	5-2
24	تحضير المزارع النقية للفطريات	6-2
25	استخدام الفطريات الصائدة للنيما تود	7-2
25	اختبار التضاد بين الفطرين الاحيائيين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> والفطريات الصائدة للنيما تود في الوسطين الزرعيين CMA و PDA	8-2
26	دراسة تأثير رواشح الفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> في نمو الفطريات للصائدة للنيما تود:	9-2
27	دراسة تأثير راشح البكتريا <i>P.fluorescens</i> في نمو الفطريات الصائدة للنيما تود	10-2
27	دراسة تأثير رواشح الفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> والبكتريا <i>P.fluorescens</i> في تكوين الكونيدات	11-2
28	استخدام تقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) لتشخيص عزلات الفطريات الصائدة للنيما تود	12-2
28	استخلاص DNA من عزلات الفطر	1-12-2
28	طريقة العمل لاستخلاص DNA	2-12-2
29	قياس تركيز DNA بجهاز Nano Drop	3-12-2
29	التوصيل الكهربائي بهلام الاكاروز	4-12-2
29	تحضير هلام الاكاروز Agarose-Gel-Electrophoresis	1-4-12-2
29	تحضير حوض الترحيل	2-4-12-2
29	الترحيل الكهربائي Electrophoresis	3-4-12-2
30	التشخيص الجزيئي لأنواع الفطريات الصائدة للنيما تود	5-12-2
31	انتاج الجسيمات النانوية من الفطريات المدروسة	13-2
32	تحضير لقاح البيوض ويرقات الطور الثاني لنيما تود العقد الجذرية <i>Meloidagyne spp.</i>	14-2
32	اختبار تأثير رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود والفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> والبكتريا <i>P.fluorescens</i> في فقس بيوض ديدان العقد الجذرية <i>Meloidagyne sp.</i>	1-14-2
33	اختبار تأثير مزيج رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود والفطر <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> في فقس بيوض ديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne. spp.</i>	2-14-2
33	اختبار تأثير مزيج رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود وراشح البكتريا <i>P.fluorescens</i> في فقس بيوض ديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	3-14-2
33	اختبار تأثير مزيج رواشح البكتريا <i>P.fluorescens</i> والفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> في فقس بيوض ديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	4-14-2
34	اختبار تأثير مزيج رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود والفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> والبكتريا <i>P.fluorescens</i> في فقس بيوض ديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	5-14-2

34	اختبار تأثير رواشح الفطريات الصائفة للنيما تود والفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> والبكتريا <i>P.fluorescens</i> على يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	6-14-2
34	اختبار تأثير مزيج رواشح الفطريات الصائفة للنيما تود والفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> على يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	7-14-2
35	اختبار تأثير مزيج رواشح الفطريات الصائفة للنيما تود والبكتريا <i>P.fluorescens</i> على يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	8-14-2
35	اختبار تأثير مزيج رواشح البكتريا <i>P.fluorescens</i> والفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> على يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	9-14-2
35	اختبار تأثير مزيج رواشح الفطريات الصائفة للنيما تود والفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> والبكتريا <i>P. fluorescens</i> على يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	10-14-2
36	التحليل الاحصائي Statistical Analysis	15-2
الفصل الثالث-النتائج والمناقشة		
38	وصف الأنواع التي سجلت لأول مرة في العراق	1-3
38	<i>Arthrotrys Cookedickinson</i> (Cooke & Dickinson) Yu, Comb. Nov. ≡ <i>Monacrosporium Cystosporum</i> Cooke & Dickinson, Trans. Br. Mycol. Soc. 48: 623 (1965)	1-1-3
38	<i>Arthrotrys Microscaphoides</i> (Liu & Lu) M. Scholler, Hagedorn & A. Rubner, Sydowia 51 (1): 103 (1999) ≡ <i>Monacrosporium Microscaphoides</i> Xing Z. Liu & B.S. Lu, Mycosystema 6: 68 (1993)	2-1-3
39	<i>Arthrotrys Rutgeriense</i> (Cooke & Pramer) Yu, Comb. Nov. ≡ <i>Monacrosporium Rutgeriense</i> R.C. Cooke & Pramer, [As 'Rutgeriensis'] Phytopathology 58:544, 1968	3-1-3
39	<i>Clonostachys rosea</i> (Link) Schroers, (1999) Samuels, comb. nov. ≡ <i>Penicillium roseum</i> Mycologia. 81 (2): 365-385	4-1-3
41	عزل وتشخيص الفطريات الصائفة للنيما تود	2-3
42	القدرة التضادية لفطري المقاومة الحيوية <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> والفطريات الصائفة للنيما تود في الوسطين الزراعيين PDA و CMA	3-3
49	دراسة تأثير رواشح الفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> في نمو الفطريات للصائفة للنيما تود:	4-3
61	دراسة تأثير رواشح مستعمرة البكتريا <i>P.fluorescens</i> في نمو الفطريات الصائفة للنيما تود	5-3

66	دراسة تأثير رواشح الفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> والبكتريا <i>P.fluorescens</i> في تكوين الكونيدات	6-3
70	استخدام تقنية (PCR) Polymerase Chain Reaction لتشخيص عزلات الفطريات الصائدة للنيما تود	7-3
71	استخدام Its1 و Its4	8-3
75	انتاج الجسيمات النانوية من الفطريات المدروسة	9-3
84	تأثير رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود والفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> والبكتريا <i>P.fluorescens</i> على فقس البيوض وموت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	10-3
85	تأثير مزيج من راشح الفطر <i>T.harzianum</i> مع رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود على فقس البيوض وموت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	11-3
87	تأثير مزيج من راشح الفطر <i>T.viride</i> مع رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود على فقس البيوض وموت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	12-3
88	تأثير مزيج من راشح البكتريا <i>P.fluorescens</i> مع رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود والفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> على فقس البيوض وموت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	13-3
89	تأثير مزيج من راشح الفطر <i>T.harzianum</i> و راشح البكتريا <i>P.fluorescens</i> مع رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود على فقس البيوض وموت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	14-3
91	تأثير مزيج من راشح الفطر <i>T.viride</i> و راشح البكتريا <i>P.fluorescens</i> مع رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود على فقس البيوض وموت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	15-3
95	الاستنتاجات	
96	التوصيات	
97	المصادر العربية	
98	المصادر الاجنبية	
I	Appendix	

## قائمة الجداول

الصفحة	عنوان الجدول	التسلسل
21	الأجهزة واسم الشركة المصنعة كل لجهاز.	1-2
22	أسماء الأوساط الزرعية والمواد الكيماوية.	2-2
25	أسماء الفطريات الصائفة للنيماتود المستخدمة في التجارب.	3-2
30	تتابع البادئات ITS1 و ITS4 المستخدمة في تقنية PCR	4-2
30	المحاليل المستخدمة في التفاعل PCR باستخدام البادئات ITS1 و ITS4	5-2
30	PCR المستخدم في تضخيم البادئات ITS1 و ITS4.	6-2
42	أنواع الفطريات المهلكة للنيماتود المعزولة وأنواع أدوات الاصطياد التي تكونها.	1-3
44	يوضح درجة التضاد بين الفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.virid</i> والفطريات الصائفة للنيماتود المدروسة على الوسطين الزرعيين CMA و PDA حسب مقياس (Bell et al., 1982)	2-3
70	التشخيص الجزيئي للفطريات الصائفة للنيماتود المختبرة	3-3

## قائمة الأشكال

الصفحة	عنوان الشكل	التسلسل
40	يوضح اشكال الكونيدات للفطرين <i>A.cookedickison</i> :A، <i>A.microscaphoides</i> :B، <i>A.rutgeriense</i> :C و D و <i>C.rosea</i> :E والـ <i>Chlamydosporium</i> للفطر <i>C.rosea</i> :F	1-3
41	يوضح اشكال الكونيدات للفطريات الصائفة للنيماتود <i>A.conoides</i> :A، <i>A.eudermata</i> :B، <i>A.oligospora</i> :C، <i>A.thaumasia</i> :D	2-3
44	معامل السيطرة A و B الفطر <i>T.harzianum</i> و C و D للفطر <i>T.viride</i> في الوسطين الزرعيين CMA و PDA.	3-3
45	التضاد بين الفطرين <i>T.harzianum</i> والفطريات الصائفة للنيماتود على الوسطين CMA و PDA، A و B ضد الفطر <i>A.conoides</i> ، C و D ضد الفطر <i>A.eudermata</i> ، E و F ضد الفطر <i>A.cookedickison</i>	4-3
46	التضاد بين الفطرين <i>T.harzianum</i> والفطريات الصائفة للنيماتود على الوسطين CMA و PDA، A و B ضد الفطر <i>A.microscaphoides</i> ، C و D ضد الفطر <i>A.oligospora</i> ، E و F ضد الفطر <i>A.thaumasia</i>	5-3
47	التضاد بين A و B الفطر <i>T.harzianum</i> ضد الفطر <i>C.rosea</i> ، C و D الفطر <i>T.viride</i> ضد الفطر <i>A.conoides</i> ، E و F الفطر <i>T.viride</i> ضد الفطر <i>A.cookedickison</i> على الوسطين CMA و PDA	6-3
48	التضاد بين الفطرين <i>T.viride</i> والفطريات الصائفة للنيماتود على الوسطين CMA و PDA، A و B ضد الفطر <i>A.eudermata</i> ، C و D ضد الفطر <i>A.microscaphoides</i> ، E و F ضد الفطر <i>A.oligospora</i>	7-3

49	التضاد بين الفطرين <i>T. viride</i> والفطريات الصائفة للنيماتود على الوسطين CMA وPDA، A وB ضد الفطر <i>A. thaumasia</i> ، C وD ضد الفطر <i>C. rosea</i>	8-3
50	تأثير راشح الفطر <i>T. harzianum</i> على نمو الفطريات الصائفة للنيماتود المختبرة	9-3
51	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>T. harzianum</i> في نمو الفطر <i>A. cookedickison</i>	10-3
51	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>T. harzianum</i> في نمو الفطر <i>A. eudermata</i>	11-3
52	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>T. harzianum</i> في نمو الفطر <i>A. microscephoides</i>	12-3
52	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>T. harzianum</i> في نمو الفطر <i>A. oligospora</i>	13-3
53	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>T. harzianum</i> في نمو الفطر <i>A. thaumasia</i>	14-3
53	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>T. harzianum</i> في نمو الفطر <i>C. rosea</i>	15-3
54	تأثير راشح <i>T. viride</i> على نمو الفطريات الصائفة للنيماتود.	16-3
57	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>T. viride</i> في نمو الفطر <i>A. conoides</i>	17-3
57	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>T. viride</i> في نمو الفطر <i>A. cookedickison</i>	18-3
58	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>T. viride</i> في نمو الفطر <i>A. eudermata</i>	19-3
58	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>T. viride</i> في نمو الفطر <i>A. microscephoides</i>	20-3
59	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>T. viride</i> في نمو الفطر <i>A. oligospora</i>	21-3
59	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>T. viride</i> في نمو الفطر <i>A. thaumasia</i>	22-3
59	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>T. viride</i> في نمو الفطر <i>C. rosea</i> .	23-3
60	تأثير راشح <i>P. fluorescens</i> في نمو الفطريات الصائفة للنيماتود	24-3
60	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>P. fluorescens</i> في نمو الفطر <i>A. conoides</i>	25-3
62	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>P. fluorescens</i> في نمو الفطر <i>A. conoides</i>	26-3
62	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>P. fluorescens</i> في نمو الفطر <i>A. cookedickison</i>	27-3
64	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>P. fluorescens</i> في نمو الفطر <i>A. eudermata</i>	28-3
64	تأثير تراكيز من راشح الفطر <i>P. fluorescens</i> في نمو الفطر <i>A. microscephoides</i>	29-3

65	تأثير تراكيذ من راشح الفطر <i>P.fluorescens</i> في نمو الفطر <i>A.oligospora</i>	30-3
65	تأثير تراكيذ من راشح الفطر <i>P.fluorescens</i> في نمو الفطر <i>A.thaumasia</i>	31-3
66	تأثير تراكيذ من راشح الفطر <i>P.fluorescens</i> في نمو الفطر <i>C.rosea</i>	32-3
67	تأثير راشح <i>T. harzianum</i> على عدد الكونيدات (كونيدة/سم <sup>2</sup> ) في الفطريات الصائدة للنيماطود	33-3
68	تأثير راشح <i>T. viride</i> على عدد الكونيدات في الفطريات الصائدة للنيماطود	34-3
69	تأثير راشح <i>P.fluorescens</i> على عدد الكونيدات في الفطريات الصائدة للنيماطود	35-3
71	حزم الـ DNA الناتجة من الترحيل الكهربائي لعزلات الفطريات الصائدة للنيماطود على هلام الأكاروز.	36-3
71	الترحيل الكهربائي بهلام الأكاروز لمنتج الـ PCR لمنطقة الـ ITS	37-3
72	الشجرة الوراثية لأنواع الفطريات الصائدة للنيماطود المدروسة	38-3
74	ترتيب الاحماض الامينية حسب نتائج تتابع القواعد النروجينية ( sequence )	39-3
76	يوضح (1) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر <i>A.conoides</i> بعد 72 ساعة من الحضن A: راشح المزرعة غير المعامل بـ $AgNO_3$ (السيطرة). B: راشح المزرعة الحاوي على جسيمات الفضة النانوية. (2) صور المجهر الالكتروني الماسح للجسيمات النانوية $AgNPs$ المنتجة من الفطر <i>A.conoides</i> (3) طيف الاشعة فوق البنفسجية – المرئية للفطر <i>A.conoides</i> بعد مرور 72 ساعة من الحضن باستخدام راشح المزرعة الفطرية كعامل سيطرة.	40-3
77	يوضح (1) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر <i>A.cookedickison</i> بعد 72 ساعة من الحضن A: راشح المزرعة غير المعامل بـ $AgNO_3$ (السيطرة). B: راشح المزرعة الحاوي على جسيمات الفضة النانوية. (2) صور المجهر الالكتروني الماسح للجسيمات النانوية $AgNPs$ المنتجة من الفطر <i>A.cookedickison</i> (3) طيف الاشعة فوق البنفسجية – المرئية للفطر <i>A.cookedickison</i> بعد مرور 72 ساعة من الحضن باستخدام راشح المزرعة الفطرية كعامل سيطرة.	41-3
78	يوضح (1) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر <i>A.eudermata</i> بعد 72 ساعة من الحضن A: راشح المزرعة غير المعامل بـ $AgNO_3$ (السيطرة). B: راشح المزرعة الحاوي على جسيمات الفضة النانوية. (2) صور المجهر الالكتروني الماسح للجسيمات النانوية $AgNPs$ المنتجة من الفطر <i>A.eudermata</i> (3) طيف الاشعة فوق البنفسجية – المرئية للفطر <i>A.eudermata</i> بعد مرور 72 ساعة من الحضن باستخدام راشح المزرعة الفطرية كعامل سيطرة.	42-3

79	<p>يوضح (1) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر <i>A.microscaphoides</i> بعد 72 ساعة من الحضانة A: راشح المزرعة غير المعامل بـ <math>AgNO_3</math> (السيطرة). B: راشح المزرعة الحاوي على جسيمات الفضة النانوية. (2) صور المجهر الالكتروني الماسح للجسيمات النانوية AgNPs المنتجة من الفطر <i>A.microscaphoides</i> (3) طيف الاشعة فوق البنفسجية - المرئية للفطر <i>A.microscaphoides</i> بعد مرور 72 ساعة من الحضانة باستخدام راشح المزرعة الفطرية كعامل سيطرة.</p>	43-3
80	<p>يوضح (1) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر <i>A.oligospora</i> بعد 72 ساعة من الحضانة A: راشح المزرعة غير المعامل بـ <math>AgNO_3</math> (السيطرة). B: راشح المزرعة الحاوي على جسيمات الفضة النانوية. (2) صور المجهر الالكتروني الماسح للجسيمات النانوية AgNPs المنتجة من الفطر <i>A.oligospora</i> (3) طيف الاشعة فوق البنفسجية - المرئية للفطر <i>A.oligospora</i> بعد مرور 72 ساعة من الحضانة باستخدام راشح المزرعة الفطرية كعامل سيطرة.</p>	44-3
81	<p>يوضح (1) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر <i>A.thaumasia</i> بعد 72 ساعة من الحضانة A: راشح المزرعة غير المعامل بـ <math>AgNO_3</math> (السيطرة). B: راشح المزرعة الحاوي على جسيمات الفضة النانوية. (2) صور المجهر الالكتروني الماسح للجسيمات النانوية AgNPs المنتجة من الفطر <i>A.thaumasia</i> (3) طيف الاشعة فوق البنفسجية - المرئية للفطر <i>A.thaumasia</i> بعد مرور 72 ساعة من الحضانة باستخدام راشح المزرعة الفطرية كعامل سيطرة.</p>	45-3
82	<p>يوضح (1) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر <i>C.rosea</i> بعد 72 ساعة من الحضانة A: راشح المزرعة غير المعامل بـ <math>AgNO_3</math> (السيطرة). B: راشح المزرعة الحاوي على جسيمات الفضة النانوية. (2) صور المجهر الالكتروني الماسح للجسيمات النانوية AgNPs المنتجة من الفطر <i>C.rosea</i> (3) طيف الاشعة فوق البنفسجية - المرئية للفطر <i>C.rosea</i> بعد مرور 72 ساعة من الحضانة باستخدام راشح المزرعة الفطرية كعامل سيطرة.</p>	46-3
84	<p>تأثير راشح الفطريات الصائدة للنيماتود والفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> والبكتريا <i>P.fluorescens</i> على فقس بيوض ديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i></p>	47-2
85	<p>تأثير راشح الفطريات الصائدة للنيماتود والفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> والبكتريا <i>P.fluorescens</i> على موت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i></p>	48-3
86	<p>تأثير مزيج من راشح الفطر <i>T.harzianum</i> مع رواشح الفطريات الصائدة للنيماتود على فقس بيوض ديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i></p>	49-3
86	<p>تأثير مزيج من راشح الفطر <i>T.harzianum</i> مع رواشح الفطريات الصائدة للنيماتود على موت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i></p>	50-3



87	تأثير مزيج من راشح الفطر <i>T.viride</i> مع رواشح الفطريات الصائفة للنيماتود على فقس بيوض ديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	51-3
88	تأثير مزيج من راشح الفطر <i>T.viride</i> مع رواشح الفطريات الصائفة للنيماتود على موت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	52-3
88	تأثير مزيج من راشح البكتريا <i>P.fluorescens</i> مع رواشح الفطريات الصائفة للنيماتود والفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> على فقس بيوض ديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	53-3
89	تأثير مزيج من راشح البكتريا <i>P.fluorescens</i> مع رواشح الفطريات الصائفة للنيماتود والفطرين <i>T.harzianum</i> و <i>T.viride</i> على موت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	54-3
90	تأثير مزيج من راشح الفطر <i>T.harzianum</i> وراشح البكتريا <i>P.fluorescens</i> مع رواشح الفطريات الصائفة للنيماتود على فقس بيوض ديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	55-3
90	تأثير مزيج من راشح الفطر <i>T.harzianum</i> وراشح البكتريا <i>P.fluorescens</i> مع رواشح الفطريات الصائفة للنيماتود على موت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	56-3
91	تأثير مزيج من راشح الفطر <i>T.viride</i> وراشح البكتريا <i>P.fluorescens</i> مع رواشح الفطريات الصائفة للنيماتود على فقس بيوض ديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne sp.</i>	57-3
92	تأثير مزيج من راشح الفطر <i>T.viride</i> وراشح البكتريا <i>P.fluorescens</i> مع رواشح الفطريات الصائفة للنيماتود على موت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية <i>Meloidogyne spp.</i>	58-3

### قائمة المختصرات

المختصر	المعنى	المختصر	الحامض الاميني المقابل
Ao	<i>Arthrobotrys oligospora</i>	A	Alanine
Ac	<i>A .conoides</i>	C	Cysteine
Ae	<i>A .eudermata</i>	D	Aspartic Acid
At	<i>A .thaumasia</i>	E	Glutamic Acid
Am	<i>A .microcaphoides</i>	F	Phenylalanine
Ack	<i>A .cookedickison</i>	G	Glycine
Cr	<i>Clonostachys rosea</i>	H	Histidine
Tv	<i>Trichoderma viride</i>	I	Isoleucine
Th	<i>Trichoderma harzianum</i>	K	Lysine
Pf	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	L	Leucine
nm	Nanometer	M	Methionine
bp	base pair	N	Asparagine
ITS	Internal transcribed spacer	P	Proline
DNA	Deoxyribonucleic acid	Q	Glutamine
CMA	Corn Meal Agar	R	Arginine
PDA	Potato Dextrose Agar	S	Serine
UV	Ultra-Violet	T	Threonine
		V	Valine
		W	Tryptophan
		Y	Tyrosine

## قائمة الملاحق

الصفحة	العنوان	التسلسل
I	Drechlerella brochopaga strain 701 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank:AY773456.1	1
IX	Arthrotrrys oligospora strain XJ-A1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KR106995.1	2
IV	Orbiliaceae sp. strain SA228 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KX953548.1	3
XIII	Orbiliaceae sp. strain SA228 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KX953548.1	4
XVII	Clonostachys rosea strain CP2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KR183785.1	5
XX	Orbiliaceae sp. strain SA228 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KX953548.1	6
XXIV	Orbiliaceae sp. strain SA228 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KX953548.1	7

# الفصل الأول

المقدمة والسعر الفخر المراجع

*Introduction & Literature review*

## 1-1: المقدمة Introduction

تتنوع أنماط الحياة للكائنات الحية الدقيقة في التربة التي ترتبط مع بعضها البعض بعلاقات إحيائية مختلفة ومنها علاقة التطفل (Parasitism) والافتراس (Predation) والتكافل (Symbiosis) فتعيش الأحياء الدقيقة بما فيها الفطريات والبكتريا وغيرها في مجموعات متداخلة كثيرة الأعداد في التربة وتعيش بعض الفطريات متناوبة مع غيرها من الأحياء في تحليل المواد العضوية وتعد الفطريات من الكائنات الدقيقة (Microorganisms) التي لها علاقات متعددة بينها وبين الكائنات الحية الأخرى ولاسيما تلك العلاقة الموجودة بين بعض الفطريات والنيماطود فتعيش مع بعض النيماطود وتتطفل عليها داخلياً أو تفترسها خارجياً وتلك هي الفطريات المهلكة للنيماطود (Nematophagous fungi) (Lopez-Llorca et al., 2006 ; Campos et al., 2017).

تُعد الفطريات المهلكة للنيماطود مجموعة فطرية ترتبط مع النيماطود بعلاقتي الافتراس والتطفل، وتمتلك هذه الفطريات القدرة على مهاجمة النيماطود الحية واصطيادها وقتلها وهضم محتوياتها وفي جميع أطوار حياتها. تصطاد الفطريات المهلكة للنيماطود فريستها بتكوين أدوات اصطياد وآليات جذب متنوعة وإفراز مواد سامة أو مضادات حيوية يمكن ان تثبط نمو الأحياء الدقيقة الأخرى ليستأثر الفطر المفترس بغنيمته، ثم يفترسها عن طريق افراز انزيمات فطرية محلله (Soares et al., 2018).

أشار Zhang et al. (2011) الى ان هناك اكثر من 700 نوع من الفطريات الصائدة للنيماطود، وأشارت الدراسات إلى ان هذه الفطريات رمية التغذية وترممها ضعيف في الظروف الطبيعية لذلك تلجأ إلى التطفل والافتراس عندما يقل الغذاء المتاح في التربة او التنافس من قبل الفطريات الأخرى عن طريق تكوين أدوات اصطياد خاصة بها (Zhang et al., 2016) ; (Campos et al., 2017)، وأشارت الدراسات الى ان اغلب هذه الفطريات اختيارية التطفل (Facultative parasites) وبالرغم من ان بعضها اجبارية التطفل على النيماطود (Hallmann et al., 2009).

أشار الباحثان Jansson and Poinar (1986) إلى ان علاقة الفطريات المهلكة للنيماطود والنيماطود موجودة قبل 25 مليون سنة حيث عثروا على بقايا متحجرة للنيماطود مصطاده من قبل بعض الفطريات الصائدة وعلى كونيديات بعض اجناسها مثل *Arthrobotrys* و *Dactyleria* و *Monacrosporium*.

تسبب النيما تود المتطفلة ضرراً كبيراً للمحاصيل الزراعية ، خلال الخمسين سنة الماضية استخدمت الكثير من المبيدات على نطاق واسع للسيطرة عليها ولكن بسبب التأثيرات السلبية لهذه المبيدات على الصحة العامة وعلى التوازن البيئي لجأ الباحثون الى البحث عن طرق بديلة في مكافحة النيما تود ومن ضمنها استخدام مبيدات اقل سمية على الصحة العامة و اقل تلويثا للبيئة بالإضافة الى استخدام البدائل عن المبيدات الكيماوية وذلك بالاستفادة من العوامل الاحيائية الموجودة أصلا كأفراد ضمن النظام البيئي (البياتي، 2005)، وكذلك استخدام بعض الكائنات الحية الأخرى مثل الفطريات المهلكة للنيما تود التي تلعب دوراً أساسياً في مهاجمة النيما تود وبيوضها لذلك تستخدم في مكافحة الحيوية (Soares *et al.*, ; Hassan and Hindi, 2015) (2018).

تمتلك الفطريات المهلكة للنيما تود قابلية على إنتاج وإفراز إنزيمات عديدة تستخدمها لاختراق النيما تود وتحليل تركيبها الداخلي ، ومن اهم الإنزيمات التي تفرزها هذه الفطريات هو انزيم البروتيز (Protease) (Segers *et al.*, 1999). وتم كذلك استخلاص انزيمات أخرى مختبريا من الفطريات المهلكة للنيما تود مثل الكايتينيز، واللايبيز، والامايليز، والبكتينيز وهذه الانزيمات جميعها شخضت بانها خارج خلوية (Yang *et al.*, 2007 ; قاسم وآخرون ، 2009a) ، واكد Barron (2003) ان بعض أنواع هذه المجموعة لها القابلية على إفراز السليوليز Cellulase واللكنيز lignase. ولو حظ أيضا ان بعض هذه الفطريات لها القابلية على إفراز انزيمات أخرى منها الأسد فوسفيتيز Acid phosphatase (Cruz *et al.*, 2009) وانزيم الفوسفولايبيز phospholipase (قاسم وآخرون ، 2009a).

درست الفطريات المهلكة للنيما تود منذ بداية القرن العشرين حيث اعتمد على دراسة الصفات المظهرية للطور اللاجنسي Anamorph مثل الكونيدات والحوامل الكونيدية ونوع أدوات الاصطياد ، وبتطور التقنية الجزيئية أصبح التصنيف القائم على الصفات المظهرية تصنيفاً غير دقيقاً احياناً بينما التصنيف الجزيئي يمكن ان يساعد في كشف وتحديد وتصنيف الفطريات المهلكة للنيما تود خصوصا تصنيف الفطريات الصائدة للنيما تود (Juan *et al.*, 2008).

## 2-1: مجاميع الفطريات المهلكة للنيما تود

### Nematophagous Fungi Groups

تضم الفطريات المهلكة للنيما تود اكثر من 700 نوع موزعة بين المجاميع الفطرية الرئيسية (Basidiomycetes ، Zygomycetes ، Oomycetes ، Chytridiomycetes)

لذلك قام الباحثون بوضع أسساً تصنيفية لها فقسمت إلى مجموعتين بالاعتماد على طبيعة تواجدها في التربة هما الفطريات الصائدة للنيما تود (Nematode-Trapping Fungi) والفطريات المتطفلة داخليا (Endonemato-phagous) (Barron, 1977) (Fungi) وقسمها الباحث (1988) Mankau الى خمس مجاميع بالاعتماد على طبيعة افتراس النيما تود وأطوارها وهي الفطريات الصائدة للنيما تود ، والفطريات المتطفلة داخليا ، والفطريات المتطفلة على البيوض (Eggs-Parasitic Fungi)، والفطريات المتطفلة على الإناث والبيوض المتكيسه (Encyste-Eggs and Female-Parasitic Fungi) والفطريات المنتجة للسموم (Toxin-Producing Fungi). وقسمت هذه المجموعة الفطرية ايضا إلى ثلاث مجاميع هي الفطريات الصائدة للنيما تود ، الفطريات المتطفلة داخليا ، الفطريات المتطفلة على النيما تود الساكنة (Fungal Parasites of Sedentary Nematodes) بالاعتماد على وسائل الاصطياد وطور النيما تود المصطاد (Dackman *et al.*, 1992). أما في الوقت الحاضر فقد قسمت الفطريات المهلكة للنيما تود على أربع مجاميع (Soares *et al.*, 2018) وهي:

### 1-2-1: الفطريات الصائدة للنيما تود Nematode-Trapping Fungi

تكون هذه الفطريات أدوات الاصطياد تستطيع بواسطتها اصطياد النيما تود وتتكون هذه الأدوات على خيوطها الفطرية ، بوجود تحفيز (Induction) ويكون هذا التحفيز في أغلب الأحيان بواسطة النيما تود أو المواد المفرزة منها أو بوجود مواد كيميائية عضوية أو لاعضوية أو إحيائية المصدر (Biological Source) (Barron, 2003). إن أدوات الاصطياد في هذه الفطريات أما أن تكون مغطاة بمواد لاصقة تستطيع مسك النيما تود وأعاقه حركتها عن طريق لصقها بقوة، وهذه الأدوات هي الشباك اللاصقة (Adhesive nets) (ثنائية و ثلاثية الأبعاد) ، العقد اللاصقة (Adhesive knobs) بنوعها المحمولة والجالسة، الأفرع اللاصقة (Adhesive branches) والخيوط الفطرية اللاصقة (Adhesive hyphae) وهناك أدوات اصطياد غير مغطاة بمواد لاصقة مثل الحلقات المتقلصة (Constricting rings) وغير المتقلصة (Non-constricting rings) (Yang *et al.*, 2007).

تشمل الفطريات الصائدة للنيما تود مجموعة كبيرة من الفطريات التي تصيب النيما تود باستخدام أدوات اصطياد خاصة، والاهتمام بدراسة التأثير الحيوي لهذه الفطريات يأتي من استخدامها كعوامل مكافحة إحيائية ضد النيما تود ، فالفطريات الصائدة للنيما تود هي أداة قوية لمثل

هذه المكافحة ، بالإضافة إلى ذلك يمكن استخدامها بأمان لأنها لا تؤثر إلا على النيماتود وليس لها تأثير سلبي مهم في البيئة (Luns et al., 2018; Swe et al., 2011).

تعد أنواع الجنس *Arthrobotrys* وبخاصة النوع *A. oligospora* من أكثر الفطريات المفترسة للنيماتود سرعة في النمو وانتشاراً في التربة وعلى المواد العضوية المتحللة منها (Yang et al., 2011).

### 2-2-1: الفطريات المتطفلة داخليا Endonematophagous Fungi

تعد هذه الفطريات إجبارية التطفل على النيماتود وتستخدم وسائل مختلفة في إصابة النيماتود فالفطر *Catenaria anguillulae* يصيب النيماتود بالابواغ المتحركة (Zoospores)، وبعضها تكون ابواغ ساكنة مثل الفطر *Meristacrum asterospermum* الذي يكون كونيديات حاوية على جزء لاصق بواسطته تصطاد النيماتود ، أما النوع الأخر من الكونيديات فتحدث الإصابة عندما تتبلع من قبل النيماتود كما في كونيديات الأنواع التابعة للجنس *Harposporium*، في حين تحتوي كونيديات الفطر *Drechmeria coniospora* عقدة أو زائدة لاصقة توجد في قمتها الكونيدية (Jansson et al., 2004). وتقضي هذه الفطريات طورها الخضري بأكمله داخلها وتكون حوامل سبورية أو كونيدية وسبورات أو كونيديات خارج جسم المضيف فقط ، وتعتمد على النيماتود كمصدراً غذائياً أساسياً لها (Lambert and Bekal, 2002 ; Mankau, 1980).

### 3-2-1: الفطريات المتطفلة على البيوض والإناث

#### Eggs-and Female-Parasitic Fungi

أشار الباحثان Braga and Araujo (2014) إلى أن الفطريات المتطفلة على البيوض والإناث هي مجموعة شائعة ومتوطنة في التربة، ويمكن أن تصيب الأطوار الساكنة مثل الإناث المتكيسة وكذلك كتل البيوض، هذه المجموعة لا تكون ولا تمتلك أدوات اصطياد، وإنما تستعمل قمة الخيوط الفطرية (Hyphal Tips) لغرض الإصابة، إذ يوجد عضو لاصق Appresorium على قمة الخيط الفطري. أغلب أفراد هذه المجموعة الفطرية إجبارية التطفل وهي مسؤولة بصورة جزئية عن كبح أعداد النيماتود المتطفلة على النباتات (Jansson et al., 2004).

أن الفطريات المتطفلة على البيوض والإناث هي مجموعة شائعة ومتوطنة في التربة وأن إناث النيماتود وكذلك بيوضها يمكن أن تصاب بفطريات متطفلة اختياريًا يمكن تسميتها بالفطريات المتطفلة على البيوض (Eggs-Parasite) (Braga and Araujo, 2014 ; Stirling, 1991).



ومن بين أنواع هذه المجموعة الفطرية تعدُّ أنواع الجنس *Pochonia* من أهم الأنواع المتطفلة اختياريًا على البيوض والشائعة الانتشار في التربة (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006).

### 4-2-1: الفطريات المنتجة للسموم Toxin-Producing Fungi

أشار الباحث Barron (2003) إلى ان الخيوط الفطرية في بعض الفطريات لها القابلية على إفراز سموم بواسطة تراكيب خاصة ومنها بعض الفطريات البازيدية المحللة للأخشاب، ولوحظ ان الفطر *Pleurotius ostreatus* يفرز سمًا فطرياً له القابلية على إيقاف أو تثبيط (Immobilization) الديدان وأن خيوطه الفطرية لها انتحاء كيميائي Chemotaxis باتجاه الفتحات الجسمية الطبيعية للديدان كاستجابة للمواد التي تطرح من تلك الفتحات (Kwok *et al.*, 1992).

ولاحظ Niu *et al.* (2010) ان بعض الفطريات المهلكة للديدان من المجاميع الثلاث اعلاه لها القدرة على إفراز نواتج ومواد سمية ، كالفطر *A. oligospora* الذي يقوم بإفراز مادة Linolic acid وهي مادة سامة للديدان ، وكذلك الفطر *Paecilomyces lilacinus* الذي يفرز حامض الخليك، وأن بعض الفطريات المهلكة للديدان تقوم بإنتاج مضادات حيوية إلى جانب اصطيادها للديدان وإفراز مواد أخرى سامة للديدان (Nematicidal Substances) (Khan *et al.*, 2010).

### 3-1: تواجد الفطريات المهلكة للديدان وانتشارها

أشارت دراسات عديدة إلى ان الفطريات المهلكة للديدان مجموعة فطرية واسعة الانتشار في مختلف البيئات وهي الكائنات المستوطنة في التربة (Soil Inhabitants) وقد عزلت من مختلف أنواع التربة (Li *et al.*, 2014)، إذ لوحظ أنها شائعة الانتشار في معظم بقاع العالم وتنتشر من المناطق الاستوائية حتى المناطق القطبية، وتتواجد في التربة الصحراوية الجافة والرمال الساحلية. أن الدراسات تؤكد على المناطق الزراعية كالحقول والبساتين وفضلات الحيوانات والمواد العضوية المتحللة وتربة الغابات هي المناطق التي يمكن ان تتواجد فيها هذه الفطريات بكثافة عالية (Chandrawathani *et al.*, 2002).

تعيش كثير الأحياء المجهرية والكائنات الصغيرة في المنطقة المحيطة بالجذور (Rhizosphere) والتي موطناً لفعاليات تلك الأحياء حيث توفر تلك المنطقة بيئة مناسبة لنموها بفعل المغذيات والمواد التي تطرح من جذور النباتات ومن تحلل الأجزاء والكائنات الميتة ومن

إفرازات تلك الكائنات (Callaghan *et al.*, 2018). أن الفطريات ضعيفة الترمم غالباً ما تنتشر في تلك المنطقة لذلك فإن هذه المنطقة تُعدّ مهمة لفعالية الفطريات المهلكة للنيماطود حيث لوحظ أنها أكثر تردداً في تربة الجذور مقارنة بالتربة البعيدة عن الجذور (Non-Rhizosphere Soil)، وأن الفطريات الصائدة تكون أكثر تردداً وانتشاراً من بقية الأنواع في تلك المنطقة لأنها تمتلك قابلية على التنافس في تلك المنطقة من خلال استعمال النيماطود مصدراً غذائياً لزيادة فرص بقائها في التربة (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006).

أشار *Bordallo et al.* (2002) إلى أن الفطريات المهلكة للنيماطود يمكن أن تستوطن منطقة Rhizosphere وأن بعضها تنمو باتجاه جذور النباتات نتيجة الانتحاء الكيميائي حيث لوحظ أن بعض الفطريات يمكن أن تنمو قرب سطح الجذور بمسافة تصل إلى 0.4-0 ملم ويعتقد أن سبب ذلك إفرازات الجذور مثل الفطر *A. oligospora*. ووجد أن بعض الفطريات الصائدة للنيماطود والمتطفلة على البيوض لها القابلية على غزو جذور النباتات حيث تنمو داخلياً (Entophytic) تحت خلايا البشرة والقشرة ووجد أيضاً أن بعضها تنمو بين الخلايا وداخلها (Zhang *et al.*, 2014 ; Jansson *et al.*, 2004).

ومن التكيفات البيئية الأخرى في هذه الفطريات أن بعض الفطريات الصائدة للنيماطود لجأت إلى تكوين تراكيب متنوعة تساعدها في اصطياد النيماطود، فنجد أن الفطر *A. superba* يستطيع أن يصطاد النيماطود بواسطة أفرع لاصقة والخلايا القاعدية لحوامله الكونيدية فضلاً عن الشباك اللاصقة (Soares *et al.*, 2018).

#### 4-1: ميكانيكية الاصطياد Mechanism of Trapping

دراسات عديدة أشارت إلى ميكانيكية الاصطياد التي تحدث بين الفطريات المهلكة للنيماطود وبين النيماطود، فبين *Nordbring-Hertz et al.* (2006) أن هذه الميكانيكية عدة خطوات، تبدأ بعملية التعرف أو التمييز (Recognition) والتي تشمل عملية التجاذب (Attraction phenomenon) تليها عملية الاتصال أو التلاصق (Contact)، يأتي بعدها تكوين أو إنتاج مواد لاصقة ثم تقوم الفطريات بإفراز الأنزيمات المحللة، والخطوة الأخيرة وهي مرحلة تكوين أدوات الإصابة والاختراق وتمييزها مثل عضو الالتصاق (Appressorium)، وأنبوب الاختراق (Penetration peg)، بعد ذلك يتم هضم محتويات النيماطود. أن النيماطود يمكن أن تتجذب نحو الخيوط الفطرية لهذه الفطريات وتؤدي إلى تحفيز تكوين أدوات الاصطياد، ويمكن أن تتجذب النيماطود أيضاً إلى أدوات الاصطياد الكاملة التكوين والى الابواغ التي تكونها تلك الفطريات.

أشارت دراسات عديدة إلى أن هناك عوامل فيزيائية وكيميائية تعمل على تحفيز وتكوين أدوات الاصطياد إضافة إلى أن تكوينها يتأثر بوجود عوامل بيئية كثيرة مثل وجود المغذيات في المادة الأساس (Jansson *et al.*, 2004 ; قاسم وآخرون 2009b).

وعند دراسة زمن تكوين وظهور أدوات الاصطياد على الخيوط الفطرية وجد أنها تحدث خلال ساعتين فقط من عملية التحفيز، وأن عملية التحفيز ذات طبيعة فيزيائية أكثر مما هي كيميائية. فتؤدي حركة النيماتود إلى انتقال المواد المذابة في طبقة الماء المحيطة بجدار النيماتود خلال الغشاء البلازمي (plasma membrane) إلى التحفيز مما يسبب حدوث تغيرات في جهد الغشاء (Membrane potential) (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006).

أشار Jansson (1982) إلى أن الجذب الكيميائي (Chemical Attraction) للنيماتود والذي يحدث بسبب وجود أدوات الاصطياد يزيد من احتمالية اصطياد النيماتود ، لذلك ان تكوين أدوات الاصطياد على الخيوط الفطرية هي عملية ضرورية تسبق عملية اصطياد النيماتود الحية.

وأشارت الدراسات إلى أن حركة الفطر أو انجذابه نحو النيماتود تمثل إحدى حالات علاقة الجذب (Attraction) بين هذه الفطريات وبين النيماتود ، فعند تحرر الأبواغ السابحة من حوافظها سوف تتحرك نحو الفتحات الجسمية الطبيعية للنيماتود (Jansson *et al.*, 2001)، وهذا ما لاحظته الباحث Nordbring-Hertz *et al.* (2006) عند دراسته للأبواغ السابحة للفطر *C.anguillulae* فوجد أنها تتحرك بطريقة الانتحاء الكيميائي (Chemotaxis) نحو الفتحات الجسمية الطبيعية الموجودة في النيماتود قبل عملية إصابة النيماتود واختراقها ، أما الحالة الثانية فتتمثل بوجود مركبات ومواد كيميائية تفرزها الخيوط الفطرية تنجذب إليها النيماتود فتتحرك نحو هذه الخيوط ، ولوحظ أيضا ان النيماتود تتحرك نحو أدوات الاصطياد في الفطريات الصائفة للنيماتود وكذلك نحو الأبواغ التي تنتجها الفطريات المتطفلة داخليا التي تفرز مثل هذه المركبات، ولوحظ أيضا أن الفطريات اجبارية التطفل تظهر جذب شديد للنيماتود ، أما الفطريات التي تكون مترمة أكثر مما تكون متطفلة فتظهر جذب اقل للنيماتود ، وبناءً على ذلك أن الفطريات المتطفلة داخليا تظهر جذباً شديداً للنيماتود أكثر من الفطريات الصائفة للنيماتود التي لها درجات متفاوتة من الترمم التي تكون أدوات اصطياد بوجود النيماتود (Jansson *et al.*, 2001).

## 5-1: استخدام طريقة التفاعل السلسلي البوليمير Polymerase Chain Reaction في تصنيف الفطريات

يحتوي الـ DNA على الصفات الوراثية للكائن الحي وجزئته الـ DNA عبارة عن حلزون مزدوج مكون وحدات يطلق عليها النيوكليوتيدات والتي تتكون من مجموعة فوسفات وسكر وقواعد نيتروجينية، ان المعلومات الوراثية تشفر في تتابع النيوكليوتيدات للمادة الوراثية واي تغير يحصل في تتابعات القواعد النيتروجينية سوف يحدث طفرة وينتج عنه تغيير في الصفات الوراثية للكائن وهذا يحصل بسبب عوامل مختلفة (Alberts *et al.*, 2008).

اكتشف الـ PCR في عام 1985 على يد العالم Karry Mullis مع العالم ميشيل سمث (Weile *et al.*, 2009) ولا تزال تستخدم حتى الوقت الحاضر على الرغم من اكتشاف طرائق اسرع وذلك لكونها اقل تكلفة من ناحية المواد والأجهزة المستخدمة في المختبر (Bretagne *et al.*, 2006).

ان تصنيف الفطريات التقليدي لا يعكس العلاقات التطويرية بين الأنواع لذا فان هذا النظام التصنيفي احياناً لا يفي بالغرض خصوصاً بالدراسات التطبيقية بسبب وجود بعض الأنواع المتقاربة جداً بالمظهر الخارجي (Bills *et al.*, 1999).

بتطور طريقة الـ Polymerase Chain Reaction (PCR) أصبح بالإمكان انتاج الاف النسخ لقطعة معينة من DNA لذا اصبح العلماء يمتلكون معلومات عن تتابع القواعد النيتروجينية للكائنات الحية وفي الوقت الحالي فان المعلومات الوراثية لألاف الفطريات مخزونه في بنك الجينات (Gene Bank) والتي لها أهمية في الدراسات الجينية (Khan *et al.*, 2018).

أشار الباحثون الى ان تعرض الفطريات الى اشعة الشمس الشديدة يؤدي الى زيادة صبغة الميلانين او عدم تكوين الحوامل الكونيدية او انتاج كونيدات مختلفة الاشكال عما لو كانت نامية في ظروف اعتيادية وهذا التباير يخلق صعوبة في تصنيفها لذا فان استخدام الطرق الجزيئية هو الأمثل في تصنيف هذه الفطريات (Selbmann *et al.*, 2005; Maicas *et al.*, 2000).

صنفت الفطريات الصائدة للنيماتود سابقاً بالاعتماد على الكونيدات (الشكل، الحواجز، الحجم) والحوامل الكونيدية (التفرعات، والتحويرات عند القمة) فوضعت في أجناس عديدة منها *Arthrotrys* و *Dactylella* و *Dactylellina* و *Dactylaria* و *Drechlerella* و *Monocrosporium* وغيرها (Glockling and Dick, 1994)

تم دراسة الرتبة *Orbiliales* (*Orbiliomycetes*) والتي تعود إليها اغلب الفطريات الصائدة للنيما تود بشكل أساسي الاعتماد على المظهر الخارجي ، إلا أن الدراسات الحديثة استخدمت تقنيات حديثة حيث شخص (Meyer and Carta, 2005) تسلسل الـ DNA في منطقة الـ ITS في أنواع مختلفة من الفطريات *Arthrotrrys* و *Monacrosporium* وكشف وجود اختلافات بين العزلات المتشابهة، بعد ذلك صنفت الفطريات الصائدة للنيما تود ضمن عائلة *Orbiliaceae* بالاعتماد المظهر الخارجي (Morphological) والدراسات الجزيئية (Molecular studies) ان تطور تقنية الـ PCR فتحت المجال لتصنيفها بشكل أكثر تطورا (Whiley and Sloots, 2005) ، لذلك فان التصنيف الحديث يعتمد على الدراسة الجزيئية ونوع أدوات الاصطياد حيث لوحظ ان الأنواع الفطرية التي تكون شبك لاصقة تكون ضمن الجنس *Arthrotrrys* والأنواع التي تكون عقد لاصقة ضمن الجنس *Dactylellina* أما التي تكون حلقات متقلصة فتكون ضمن الجنس *Drechlerella* (Zhang et al., 2014) واستخدمت التقنية الجزيئية من قبل الباحث (Wang et al., 2018) للفطر *A. oligospora* وكذلك دراسة التسلسل الجيني (DNA Sequence) له.

#### المفتاح العام للفطريات الصائدة للنيما تود تابعة لعائلة *Orbiliaceae*

- 1- أدوات الاصطياد – حلقة متقلصة والتي تتكون من ثلاث خلايا متضخمة محمولة على ساق قصيرة وقوية ..... *Drechlerella*
- 2- أدوات الاصطياد – ليست حلقات متقلصة ولكن أدوات اصطياد لاصقة مختلفة ..... 3
- 3- أدوات اصطياد عقد لاصقة جالسة (unstalked) التي تتطور الى شبكة او شبك لاصقة فقط ..... *Arthrotrrys*
- 4- أدوات الاصطياد عقد لاصقة محمولة (stalked)، قد تكون مع حلقات غير متقلصة، او عقد لاصقة جالسة تنمو لتكون فروع لاصقة او خيوط ملتفة ..... *Dactylellina*

#### 6-1: قابلية الفطريات على إنتاج الجسيمات النانوية

لقد أصبحت تقنية النانو في مقدمة العلوم لأنها تربط العلوم في المجالات المتعددة مثل الفيزياء والكيمياء وعلوم الاحياء والعلوم الطبية، ان كلمة نانو مشتقة من كلمة اغريقية Nanos وتعني صغير الحجم وقد استخدمت للإشارة الى الواحد من المليار من المتر (10<sup>9</sup>×1) وفي هذه التقنية يتم التعامل مع المواد التي ابعادها تقل عن 100 نانومتر، وتتضمن الجسيمات النانوية ( Nano Particles) (NPS) اما جسيمات عضوية مثل جسيمات الكربون النانوية او لا عضوية كالذهب

والفضة والالمنيوم والنحاس والتي تستخدم في العديد من التطبيقات البيولوجية والفيزيائية والكيميائية والطبية (Kannan and Subbalaxmi, 2011).

يرجع تاريخ علم النانو الى الحضارات القديمة التي استخدمت هذه التقنية مثل صنع الفخاريات البراقة وطلائها كما استخدم صانعو الزجاج الاوربيون في العصور الوسطى جسيمات الذهب والفضة للتلون في صناعة الزجاجيات وأول من عرف هذا العلم هو العالم Norio Taniguchi عام 1974 وأجريت بعده عدة دراسات في هذا المجال (Saxena *et al.*, 2014).

ان مضمون تقنية النانو هو إنتاج مواد معدنية ذات أبعاد لا تتجاوز 100 نانومتر وصولاً إلى الذرات الفردية حيث تؤدي الى إعادة ترتيب الذرات مما ينتج عنه بناء جسيمات جديدة ذات مواصفات جديدة تختلف عن المواد الأساسية المكونة لها حيث ان النظرية التي تستند عليها التقنية هي كلما صغر حجم الجسيمات زادت نسبة المساحة السطحية الى الحجم وبالتالي فان الجسيمات الجديدة الناتجة سوف تمتلك خصائص كيميائية جديدة مثل زيادة سرعة التفاعلات الكيميائية (Moharrer *et al.*, 2012).

توجد العديد من الاحياء القادرة على انتاج الجسيمات النانوية مثل البكتريا والفطريات والنباتات اما بطريقة داخل خلوية (Intracellular) او خارج خلوية (Extracellular) كما ان الفطريات امتازت بصفات جعلت استخدامها في تقنية النانو أفضل فهي تفرز كميات كبيرة من انزيمات الخارج خلوية والتي تعمل على تحفيز ايونات العناصر الثقيلة لتكوين الجسيمات النانوية أيضا سهولة عزل الفطريات في مزارع سائلة كما انها تحتاج الى متطلبات غذائية بسيطة وسهولة الحصول على مزارع نقية منها (Rai *et al.*, 2009).

عند انتاج الجسيمات النانوية داخل خلوية فان العناصر الثقيلة ترتبط بجدار الخلية الفطرية بواسطة الانزيمات او البروتينات الموجودة في جدار الخلية والايونات المعدنية سوف تختزل بواسطة الانزيمات وهذا يؤدي الى تجميع الايونات المعدنية وتكوين الجسيمات النانوية (Thakkar *et al.*, 2010). اما تصنيع الجسيمات النانوية بطريقة خارج خلوية نتيجة لتفاعل ايونات العناصر مع الانزيمات المتحررة وهي الانزيمات المختزلة وبذلك تتكون جسيمات نانوية في المحلول وهذه الطريقة تكون أسهل لأنها لا تتطلب تحليل الخلية الفطرية لتحرير وتنقية الجسيمات النانوية من الكتلة الحية للفطر Biomass وهذا يحتاج الى عمليات تنقية متعددة (Gade *et al.*, 2008).

وتم إنتاج جسيمات الفضة النانوية بحجم 20-45 نانومتر وجسيمات الذهب النانوية بحجم 12 نانومتر من الفطر *Alternaria alternata* (Sarkar et al., 2011) وقام Nayak et al., (2014) بإنتاج جسيمات الفضة النانوية من الفطر *Achlamydospora* بقطر 20-33 نانومتر وتم دراسة تأثيراتها المثبطة ضد البكتريا.

وقام Nayak et al., (2015) بإنتاج جسيمات الفضة النانوية من الفطر *A. alternata* بقطر 50-60 نانومتر واختبار فعاليتها المثبطة للبكتريا المرضية. ومن الدراسات المحلية في هذا المجال هي دراسة حاجم (2014) حيث تم إنتاج جسيمات الفضة النانوية من الفطريات *Macrophomina phaseolina*، *Curvularia tuberculata*، *Humicola grisea* و *Nigrospora sphaerica* وتم دراسة تأثيرها المثبط على البكتريا المرضية.

وقام عبدالله (2015) بإنتاج جسيمات الفضة النانوية من الفطريات *Alternaria alternata*، *Achlamydospora*، *Acitri*، *A. raphani*، *A. longipes* وشخصت الجسيمات النانوية باستخدام طيف الأشعة فوق البنفسجية والمجهر الإلكتروني في تصنيفها.

دراسات عديدة أجريت للكشف عن قابلية بعض الفطريات الصائدة للنيما تود على تكوين الجسيمات النانوية خارج الخلايا منها دراسة Costa et al. (2017) الذي أشار الى ان الفطر *Duddingtonia flagrans* له القابلية على إنتاج الجسيمات النانوية بقطر 11-38 نانومتر مع الفضة حيث قام الباحث بتشخيص الجسيمات النانوية باستخدام تقنيات متعددة منها التقنية المطيافية (UV-Visible spectroscopy)، ودرس Wang et al. (2013) الجسيمات النانوية التي ينتجها الفطر *A. oligospora* واستغلالها في التطبيقات الطبية الحيوية حيث تم تشخيصها باستخدام المجهر الإلكتروني وكان متوسط حجمها 360-370 نانومتر.

### 7-1: الفطرين *Trichoderma harzianum* and *T. viride*

تعتبر أنواع الجنس *Trichoderma* من الفطريات المهمة والتي تتصف بعضها بنموه السريع وسيادته على فطريات التربة إذ يمتلك فعالية عالية ضد الفطريات الأخرى، حيث يستطيع تحليل جدران الخلايا والمكونات الأخرى لمرضات الجذور عن طريق افراز انزيمات محللة خارج خلوية مثل انزيم Cellulase و Chitinase (Roco et al., 2001; Burch et al., 2002) ويعد من أحد الأجناس الرمية الواسعة الانتشار في التربة (Harman, 2006). استغل الانسان هذا الفطر في مجال مكافحة الحيوية (Biocontrol) بصورة واسعة اذ تستخدم المواد

الايضية الثانوية المستخلصة من هذا الفطر بوصفها عوامل سيطرة حيوية لحماية البذور من الإصابة بالفطريات المختلفة (Muhammed *et al.*, 2003 ; Chet, 1992).

وجد (Bjorkman *et al.*, 1998) ان هذا الفطر يلعب دورا مهما في تثبيط جميع الممرضات الموجودة في التربة الزراعية والمسببة لأمراض كبيرة او بسيطة وان له القدرة على استخدام المواد المتفسخة البسيطة غير السامة كبدئ للنمو بالإضافة الى قدرته على زيادة نمو النبات وتطويره وخاصة النمو الجذري واعتماداً على هذه الدراسة اكتشف الباحث (Singh *et al.*, 2007) عدة أنواع تابعة للجنس *Trichoderma* لها القدرة على زيادة تفرعات الجذور وتغلغلها في التربة وبذلك تزيد من نمو المحصول وتزيد من مقاومة النبات للجفاف إضافة الى ما تقدم فان جنس *Trichoderma* ينتج العديد من الانزيمات الخارج خلوية ومنها إنزيمات Cellulase و Protease و Hemicellulase (Valero *et al.*, 2007).

يعد الفطر *Trichoderma* من الفطريات المتوطنة في التربة (Soil-born fungi) (Intana and Chamswarnng, 2007)، اكتشف الباحث Person الجنس *Trichoderma* اول مره عام 1749 معتمداً في ذلك على الطور اللاجنسي الذي عزله من التربة والمواد العضوية (Grondona *et al.*, 1997) ويعد الباحث Weindling اول من أشار الى أهمية أنواع الفطر *Trichoderma* في المكافحة الحيوية في عقدي الثلاثينات والاربعينات من القرن الماضي (Naher *et al.*, 2014)، كما صنفه Rifai عام 1963 الى تسعة أنواع اعتمادا على الصفات المظهرية والتي تشمل النمو وكثافة تجمعات الابواغ (Population) والتشكيل (Morphogenesis) والإنبات (Germination) وإنتاج الابواغ (Sporulation) ونواتج الايض الغذائي (Metabolite) (Alexopoulos *et al.*, 1996). يعود الجنس *Trichoderma* الى قسم الفطريات الناقصة Deuteromycota وصف Hyphomycetes ورتبة Moniliales وعائلة Moniliaceae وطوره الجنسي يعود الى قسم الفطريات الكيسية Ascomycota والصف Pyrenomycetes ورتبة Hypocreales وعائلة Hypocreaceae وجنس *Hypocrea* (Agrios 1997).

أن أول من استعمل عزلات الفطر *Trichoderma* بوصفة مبيدا احيايياً هو الباحث Weindling (1932) إذ استطاع إثبات قدرة الفطر *T.lignorum* في السيطرة على نشاط أنواع عديدة من فطريات التربة الممرضة وانتقلت التجارب بعدها من المختبر الى مجال التطبيق في الحقل واستطاع الباحث نفسه في سنة (1934) من خفض نسبة الإصابة بمرض سقوط البادرات



(Damping off) في الليمون المتسبب عن الفطر *R. solani* عن طريق إضافته الى تربة حامضية معقمة . وأكد (1982) Bell على ان الفطر *T.harzianum* ذو قدرة عالية اتجاه العديد من المسببات المرضية للنبات مثل *R. solani* و *Pythium aphanideratum* و *Phytophthora parasitica* وان الفطر يمكن ان يؤدي دورا مهما في تقليل الامراض المتسببة عن الفطريات المذكورة.

وجد ان الفطر *T.viride* أدى الى خفض عدد يرقات نيماتود العقد الجذرية *M.incognita* في التربة وعدد العقد الجذرية والاناث واكياس البيض في الجذور فضلا عن زيادة معايير النمو والإنتاج في النبات (Goswami et al., 2012). واكد Siddiqui et al. (2001) ان الفطر *T.harzianum* و *T.viride* لهما القدرة العالية في اختزال نسبة فقس البيوض وكذلك في التأثير على النسبة المئوية لموت يرقات الطور الثاني لنيماتود تعقد الجذور *Meloidogyne sp.* في نبات الباميا .

يعد الفطر *Trichoderma* من الفطريات التي اثبتت فعاليتها كمبيدات احيائية ضد العديد من المسببات المرضية المستوطنة في التربة سواء كانت فطرية او بكتيرية او النيماتود الممرضة للنبات (Sharma and Pandey, 2009) ويمثل هذا الفطر 50% من المبيدات الاحيائية الفطرية المتوفرة في الأسواق (Valero et al., 2007)

استعملت عوامل مكافحة الاحيائية (Biological Control Agents) كبديل في مكافحة امراض النبات ومن أهم العوامل المستعملة هي أنواع الفطر *Trichoderma* الذي يعد من فطريات التربة (Soil borne fungi) الذي استعمل بشكل واسع في مجال المكافحة الاحيائية (Intana and Chamswarng, 2007) الذي يمكن استعمالها بشكل مبيدات احيائية ففي العراق أمكن انتاج مبيد التحدي *T.harzianum* تجاريا وعلى نطاق واسع منذ بداية التسعينات لمكافحة نيماتود تعقد الجذور ونيماتود الحمضيات وتداخلتهما مع فطريات التربة (أنطوان واخرون، 2006).

تمتاز الاحياء المستعملة كعوامل احيائية 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 مكافحة على تكرار نشاطها ضد العديد من مسببات المرضية (مولان واخرون، 2005) ويكون الفطر *Trichoderma* اقل تأثيراً على الإنسان (kader, 2008).

### 8-1: البكتريا *Pseudomonas fluorescens*

تمتاز البكتريا *P. fluorescens* بقدرتها على تشجيع نمو النبات حيث شاع تسميتها ببكتريا الجذور المحفزة للنمو (PGPR) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria ، اذ ان لهذه البكتريا القدرة على تثبيت النتروجين وزيادة تيسير العناصر الضرورية في محلول التربة والتأثير على الجذور وشكلها والقدرة على بناء او تغيير تركيز منظمات النمو والقدرة على التضاد او تخفيف تأثير الممرضات بتكوين المركبات الخالبة لعنصر الحديد (Iron-chelating siderophores) وبعض الانزيمات مثل الكايتينيز Chitinase والمضادات الاحيائية وتستطيع البكتريا بناء انزيم ACC deaminase مما يخفض تركيز الاثيلين وبالتالي تنشيط النمو (Al-Whaibi, 2006).

توسع استخدام أنواع البكتريا *Pseudomonas* وبالأخص النوع *P. fluorescens* في العقود الأخيرة في مكافحة المسببات المرضية المنتشرة في منطقة الجذور وان السبب الذي جعلها في موقع الصدارة هو قابليتها على تشجيع نمو النبات وإنتاج المضادات الاحيائية وكذلك قدرتها على مقاومة الظروف البيئية غير الملائمة (Nagachandrabose, 2018) اذ وجد ان معاملة التربة بالبكتريا *P. fluorescens* أدى الى زيادة الانبات إضافة اختزال النيماتود في النبات المدروس (Colagiero et al., 2018).

أجرى الباحث Siddiqui et al. (2003) تجربة استعمل فيها بكتريا *P. fluorescens* على يرقات الطور الثاني لنيماتود العقد الجذرية *Meloidogyne sp.* وظهرت النتائج ان معاملة التربة بهذه البكتريا قد خفضت أعداد اليرقات في الجذور.

تعد أنواع البكتريا *Pseudomonas* من مقومات برامج مكافحة الحياتية المهمة في الوقت الراهن على المستوى المختبري نظراً للتفوق الذي اظهرته في مكافحة نشاط العديد من الممرضات (الاسدي، 2009). كما أشار Siddiqui et al. (2002) الى ان استخدام البكتريا *P. fluorescens* لاقى نجاحات كبيرة في وقاية النبات حيث عملت على زيادة نمو النبات وحمايته من الممرضات ، كما وأشار Siddiqui و Shaukat (2003) الى ان البكتريا أدت إلى اختزال فقس بيوض *Meloidogyne* إضافة الى قتل يرقات الطور الثاني (Siddiqui and

(Shaukat 2003). ان استخدام البكتريا *P.fluorescens* مع الفطر *T.harzianum* سوياً أدى الى اختزال كبير في عدد الديدان *Meloidogyne sp.* (Siddiqui and Shaukat, 2004).

### 9-1: ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne sp.*

تعد ديدان تعقد الجذور *Meloidogyne spp.* من اهم الديدان المتطفلة على النباتات وأخطرها في العالم (Gouveia *et al.*, 2017). وكذلك اشتراكها مع الاحياء الأخرى لاسيما الفطريات الممرضة في احداث الكثير من المعقدات المرضية والتي يصعب مكافحتها فضلا عن مقدرتها على كسر مقاومة النباتات لبعض الأمراض او اضعاف مقاومة النباتات وتهينتها للإصابة بأحياء ثانوية اخرى (Turatto *et al.*, 2018).

تعد نيماتود تعقد الجذور *Meloidogyne sp.* من اهم اجناس نيماتود النبات وأكثرها انتشاراً في العالم (Tao *et al.*, 2017) وقد اكتشفت هذه النيماتود من قبل العالم Berkeley عام 1855م في إنكلترا على جذور نباتات الخيار النامية في البيوت الزجاجية (Mitkowski and Abawi, 2003). يعرف حتى الان من الجنس *Meloidogyne* حوالي 75 نوعاً اربعة منها هي الأكثر شيوعاً في الترب الزراعية وتشكل اكثر 95% من أنواع نيماتود تعقد الجذور في الأراضي الزراعية في العالم وهذه الأنواع *Meloidogyne javanica* و *M.incognita* و *M.arenaria* و *M.hapla* (أبو غربية واخرون 2010).

تسبب هذه الأنواع من النيماتودا مرض تعقد الجذور (Root-Knot) لأكثر من 3000 نبات في جميع انحاء العالم (Taylor *et al.*, 1978). أشار (Stephan *et al.*, 1998) بان هذه النيماتود لها حوالي 111 عائلاً نباتياً في العراق، تصاب جميع القرعيات بنيماتود تعقد الجذور (Root-Knot Nematode) التي تتبع الجنس *Meloidogyne* (حسن، 2001).

### 10-1: السيطرة الحيوية Biological control

اشار الباحث (Timper 2014) إلى انه يتم حالياً السيطرة على النيماتود المتطفلة على النباتات الشائعة باستخدام مبيدات النيماتود (Nematicides) والممارسات الزراعية واستخدام الأصناف المقاومة للنيماتود، على الرغم من نجاح استخدام المواد الكيميائية للسيطرة الفعالة على الآفات الزراعية، إلا ان هذه المركبات لها الكثير من السلبيات منها انها تشكل خطراً كبيراً على صحة الإنسان والبيئة، وبقائها واستمرارها في البيئة لسنين عديدة، وظهور سلالات او عزلات من الممرضات المقاومة، مما يؤدي إلى استخدام مواد كيميائية أكثر كفاءة وشدة. ان مثل هذه الإجراءات ولدت مخاوف حول العالم. ادى ذلك الى اهتمام علمي متزايد بوضع استراتيجيات

متكاملة لمكافحة الآفات من أجل الحد من استخدام المبيدات الكيميائية التي ينبغي أن تكون أكثر فعالية وأقل تلوثاً، مثل الإدخال المباشر لعامل السيطرة الحيوية (أي كائن محدد من شأنه أن يقلل بسرعة من أعداد النيماتود و أو يحمي البادرات والشتلات النامية من الإصابة) (Herrera- Estrella *et al.*, 2016) أدى ذلك إلى انحسار استعمال هذه المبيدات في السيطرة الحيوية. لذلك وجد العلماء إن من أهم البدائل التي يمكن استعمالها في هذه السيطرة هي الفطريات المهلكة للنيماتود التي تعدّ أعداء طبيعية ويمكن استعمالها بوصفها عوامل سيطرة حيوية ضد النيماتود المتطفلة على النباتات والحيوانات على حد سواء (Moosavi and ; Nordbring-Hertz *et al.*, 2006) (Askary, 2015).

إن استعمال هذه الفطريات المهلكة للنيماتود في السيطرة الحيوية على النيماتود المتطفلة على النباتات لها تاريخ طويل ، فأجريت بحوث كثيرة حول إمكانية استعمال هذه الفطريات في السيطرة الحيوية وأعطت نتائج مختلفة، فقد أظهرت بعض الدراسات نتائج جيدة، ودراسات أخرى أعطت نتائج غير واضحة أو سلبية أحيانا (Jansson and Lopez-Llorca, 2004). إن اختلاف القابلية الافتراضية لهذه الفطريات يعود إلى اختلاف أنواعها بل وجد أن عزلات النوع الواحد تختلف في قابليتها الافتراضية عند استعمالها في السيطرة على أنواع مختلفة من النيماتود (Gomes *et al.*, 2001) ، فلاحظ أن من بين 5 عزلات تابعة للفطر *D.coniospora* استطاعت 4 عزلات فقط أن تصيب النيماتود المتطفلة على النباتات *Ditylenchus dipsac* (Dackman *et al.*, 1992) ، وبين (Kumar and Singh 2010) بأن عزلة واحدة من بين 5 عزلات الفطر *Drechlerella brochopaga* كانت الأكثر كفاءة في اصطياد يرقات الطور الثاني J2 للنيماتود *M.incognita* ولكن على العموم إن الأسباب التي أدت إلى ظهور نتائج مختلفة ربما يرجع إلى أمور عديدة أهمها هو عدم معرفة واضحة ودقيقة حول بيئة هذه الفطريات وفسلجتها (Barron, 2003).

أدخلت مكافحة الاحيائية باستخدام الفطريات المهلكة للنيماتود ديدان تعقد الجذور وأبرزها الفطريات *Verticillium* ، *Paecilomyces lilacinns* ، *Arthrobotrys irregularis* و *chlamydosporium* والتي كانت من أقدم وأكثر الفطريات المستخدمة في مكافحة هذه الآفة (Zhang *et al.*, 2014).

أشار (Dackman *et al.* 1992) إلى أن هناك ثلاث طرق محتملة يمكن بواسطتها يمكن استخدام الفطريات المهلكة للنيماتود في السيطرة الحيوية وهي:

### 1-11-1: السيطرة الطبيعية Natural Control

أن الفطريات المهلكة للنيماتود تعدّ عدواً طبيعياً للنيماتود في التربة، دراسات عديدة أشارت المحاصيل الزراعية يمكن ان تصاب بالنيماتود مما يؤدي إلى حدوث أضرار كبيرة وهذه الأضرار تختلف من حقل الى آخر، ويعتقد أن سبب هذا الاختلاف يعود إلى وجود هذه الفطريات في تربة تلك الحقول التي تعمل على كبح أعداد تلك الديدان (Yuen *et al.*, 2017). وأشار الباحث Chandrawathani *et al.*, (2004) ان وجود هذه الفطريات في التربة أدى إلى انخفاض واضح في اعداد النيماتود المتطفلة على النباتات.

تفرز الفطريات الصائدة للنيماتود انزيمات منها والبروتيز Protease حيث تقوم هذا الانزيمات باختراق قشرة (Cuticle) النيماتود وان انزيم Chitinase يؤثر بشكل كبير على تقفيس بيوض النيماتود وكذلك موت اليرقات وكذلك تقوم بإفراز انزيمات محللة (Hydrolyzing enzymes) ولهذه الانزيمات فعالية عالية على تحلل (Hydrolysis) البروتينات في قشرة النيماتود (Yang *et al.*, 2011)

### 2-11-1: إضافة الفطريات إلى التربة Addition of Fungi to Soil

يعتبر الباحث Linford *et al.* (1938) اول من استعمل الفطريات المهلكة للنيماتود للسيطرة على النيماتود المتطفلة على النباتات عن طريق اضافة أنواعاً من هذه الفطريات إلى التربة، لكن المحاولات الحقيقية لاستخدام بدائل عن مبيدات النيماتود باستخدام منتجات حيائية (Bioproducts) كانت عام 1977 (Ferris *et al.*, 1992)، من الناحية النظرية، ان إدخال عوامل السيطرة الاحيائية في التربة أو وضعها على البذور أو الجذور هو لتحقيق مستوى مقبول من السيطرة ، لذلك بدأت العديد من الدراسات تبحث عن الكائنات الحية الدقيقة التي لها كفاءة سيطرة عالية (Moosavi and Askary 2015). محاولات كثيرة أجريت في هذا الصدد منها باستعمال الفطريات المتطفلة داخليا كالفطرين *D.coniospora* و *H.rhossoliensis* وكذلك الفطر المتطفل على البيوض *P.chlamydosporia* (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006). ان هذه يمكن أن تكون أكثر كفاءة في السيطرة الحيوية، لذلك أجريت دراسات وبحوث لاحقة لغرض استعمال هذه الفطريات في هذا المجال (Yan *et al.*, 2011). وبين الباحثان Hay and Bateson (1997) بأن الفطر *H.rhossoliensis* وهو متطفل داخليا استطاع أن يخفّض أعداد النيماتود على جذور نبات البرسيم *Heterodera trifolium*.

ان استعمال الفطريات الصائدة للنيماتود في السيطرة الحيوية تطور خلال السنوات الأخيرة (Soares *et al.*, 2006)، ف لوحظ أن الفطر *A.dactyloides* استطاع أن يخفض نسبة إصابة جذور نبات الطماطة بنيماتود العقد الجذرية (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006) ، أكد الباحث Gomes *et al.*, (1999) بأن النيماتود حرة المعيشة *Panagrellus spp.* قد انخفضت أعدادها بشدة عند استعمال أنواع عدة من الجنسين *Arthrobotrys* و *Monacrosporium* ، ان استعمال التراكيب التكاثرية التي تكونها الفطريات المهلكة للنيماتود فتحت المجال امام الباحثين لاستخدامها عوامل سيطرة حيوية فوجد ان الابواغ الكلاميدية (Chlamydospores) والابواغ المقاومة استطاعت أن تخفض نسبة الإصابة بالنيماتود المرضية (Chartier ; Waller *et al.*, 2001) و من أجل زيادة كفاءتها في السيطرة الحيوية استخدمت تقنيات الهندسة الوراثية من أجل تحسين القابلية الأفراسية للفطريات المهلكة للنيماتود (Swe *et al.*, 2011).

### 1-11-3: تحفيز التضاد الأحيائي Stimulation of Resident Antagonists

اشار (Bouwman *et al.* (1994) ان إضافة مواد عضوية إلى التربة ساعد في زيادة كثافة هذه الفطريات الى أكثر من 10 مرات في الحقول الزراعية مما أدى الى زيادة كبح النيماتود. ولاحظ (Khan *et al.*, 2001) ان زيادة احتمالية كبح أعداد النيماتود المرضية أو تقليلها مثل نيماتود العقد الجذرية يتم بإضافة مواد عضوية إلى التربة. يعتقد ان هذه الاضافة تساعد على زيادة أعداد البكتيريا ومن ثم زيادة أعداد النيماتود المتغذية على البكتيريا (Bacterivorous Nematodes) وهذا يؤدي إلى زيادة اعداد الفطريات المهلكة للنيماتود وبالتالي احتمالية زيادة كفاءتها الأفراسية (Bouwman *et al.*, 1994 ; Zhang *et al.*, 2014) . لذلك يؤكد الباحثون على ضرورة التوسع في استخدام هذه الفطريات خصوصا عند مزجها بعوامل إحيائية اخرى (Szabó, 2014) وكذلك البحث عن مواد أو وسائل خاصة تساعد على تحفيز القابلية الأفراسية لهذه الفطريات وتشجيع إجراء تجارب تستعمل فيها محفزات ليس لها أية تأثيرات سلبية في نمو هذه الفطريات (Ooij, 2011).

## 12-1: الهدف من الدراسة The Aim of study

لأهمية هذه الفطريات ثم وضع هذه الدراسة لغرض التعرف على اهم الانواع الموجودة في محافظة ميسان ودور فطريات التضاد وبكتريا *P.fluorescens* في كفاءتها في تقليل اعداد الـنيماتود الضارة وتضمنت محاور الدراسة ما يلي:

1. عزل وتشخيص الفطريات المهلكة للـنيماتود من التربة الزراعية يتضمن عزل هذه الفطريات وتشخيصها وعمل مزارع نقيه لها.
2. دراسة جزيئية لبعض الفطريات الصائدة للـنيماتود المعزولة باستخدام تقنية PCR ودراسة الـSequence.
3. دراسة التضاد الفطري بين الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* وبعض الفطريات الصائدة للـنيماتود المعزولة خلال الدراسة.
4. دراسة تأثير رواشح الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* وراشح البكتريا *P.fluorescens* على النمو الشعاعي لبعض الفطريات الصائدة للـنيماتود.
5. دراسة تأثير كل من رواشح المستعمرات السائلة لبعض الفطريات الصائدة للـنيماتود والفطرين *T.harzianum* و *T.viride* والبكتريا *P.fluorescens* على تفقيس بيوض نيماتود العقد الجذرية *Meloidogyne spp.* Root-Knot Nematode والطور الثاني لها.
6. الكشف عن قابلية الفطريات الصائدة للـنيماتود على انتاج الجسيمات النانوية، وتشخيص الجسيمات النانوية بالمجهر الالكتروني الماسح.

# الفصل الثاني

المواد وطرق العمل

*Materials & Methods*



## 1-2: الأجهزة والمواد المستخدمة Instruments and material used

جدول (1-2) الأجهزة واسم الشركة المصنعة لكل جهاز.

اسم الشركة	اسم الجهاز	ت
Hirayama	Autoclave	1
Lab Tech	Biosafety Cabinet	2
National	Blander	3
Canon	Camera	4
Hettich	Centrifuge	5
Olympus	Compound Microscope	6
Memmert	Distiller	7
Mupid-One	Electrophoresis Meter	8
Human lab	Incubator	9
Shownic	Microwave	10
Lab Tech	Oven	11
Lobcco	PH-meter	12
Sartorius	Sensitive Balance	13
Zenith lab	Shaking Incubator	14
Prime	Thermocycler	15
Shimadzu	UV-Visible Spectroscopy	16
Knf laboport	Vacum	17
LAB-MX-F	Vortex	18
Binder	Water Bath	19
Suntex	Colony counter	20
Dragon	Micropipettes	21
Optizen	Nanodrop	22

جدول (2-2) أسماء الأوساط الزرعية والمواد الكيميائية.

اسم الشركة	اسم المادة	ت
Himedia	Agar	1
Fluka	Blue-lactophenol	2
Sigma-Aldrich	Corn Meal Agar	3
Petrochina	Deionized Water	4
Difo	Dextrose	5
Scharlau	Ethanol	6
Whatman No.1	Filter Paper	7
BDH	Hydrochloric Acid	8
Whatman	Millipore Filter 0.22	9
Himedia	Nutrient Broth	10
Merck	Oxygen peroxide	11
Durvet	Penicillin	12
Oxoid	Potato Dextrose Agar	13
Polifleks	Ringers Solution	14
Ferak	Silver Nitrate	15
BDH	Sodium Hydroxide	16
Sehat	Sodium Hypochlorite	17
Nufarm	Streptomycin	18
Bioneer	DNA Ladder	19
Bioneer	ITS Primer	20
Fisher scientific	Agarose	21
Bioneer	Bromophenol blue	22
Merck	Ethedumbromid	23
Bioneer	Master Mix	24
Biobasic	TBE	25

**2-2: جمع العينات Sample Collection**

تم جمع 90 عينة من ترب مناطق مختلفة في محافظة ميسان وعلى فترات زمنية مختلفة ابتداء من كانون الثاني 2018 لغاية اذار 2018 وقد جمعت العينات من أنواع مختلفة من الترب الزراعية منها ترب البساتين والحقول الزراعية، وعلى عمق 15-30 سم ووضعت العينات في أكياس نايلون وعلمت ثم جلبت الى المختبر لغرض عزل وتشخيص الفطريات منها.

**2-3: الأوساط الزراعية المستخدمة Culture Media****1-3-2: وسط اكار- ماء (WA) Water – Agar media**

أستعمل هذا الوسط في عزل الفطريات المهلكة للنيما تود من التربة بحسب طريقة Jansson and Jaffee (1990) وبنسبة 2 % أكار- ماء حيث أذيب 2 غم من مسحوق الأكار في 100 مل ماء مقطر في دورق زجاجي.

**2-3-2: وسط اكار- خلاصة الذرة (CMA) Corn Meal Agar**

أستعمل هذا الوسط للحصول على مزارع نقية (Pure Cultures) للفطريات الصائفة للنيما تود وحضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة.

**3-3-2: وسط خلاصة الذرة السائل (CMB) Corn Meal Broth**

أستعمل هذا الوسط للحصول على راشح الفطريات الصائفة للنيما تود وحضر كالاتي اذيب 40 غم من مسحوق الذرة الصفراء في 1000 مل من الماء المقطر، سخن الخليط بدرجة حرارة 60 م لمدة ساعة واحدة، رشح الخليط باستعمال ورق ترشيح Whatman No.1 وأكمل الراشح الى 1000 مل بالماء المقطر.

**2-3-4: تحضير الوسط بطاطا-دكستروز-اكار (PDA) Potato Dextrose Agar**

أستعمل هذا الوسط لتنمية الفطرين *Trichoderma* و *Trichoderma harzianum* و *viride* وحضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة.

**2-3-5: وسط بطاطا - دكستروز السائل (PDB) Potato Dextrose Broth**

أستعمل هذا الوسط في تحضير رواشح الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* حيث قطعت 200 غم من البطاطا الى قطع صغيرة وأضيف لها 1000 مل من الماء المقطر وبعد ان تم غليها وهرسها تم ترشيحها باستخدام شاش طبي، ثم اكمل الراشح بالماء المقطر الى 1000 مل واطيف لها 20 غم من سكر الدكستروز.

**6-3-2: تحضير وسط المرق المغذي (Nutrient Broth (NB)**

أستعمل هذا الوسط في تنمية البكتريا *P. fluorescens*، حضر هذا الوسط حسب مواصفات الشركة المنتجة.

تم تعقيم جميع الأوساط الزرعية أعلاه بجهاز المؤصدة البخاري (Autoclave) بدرجة حرارة 121م° وضغط 15 باوند/انج<sup>2</sup> لمدة 20 دقيقة.

**4-2: عزل الفطريات من التربة Isolation of fungi from soil**

استخدمت تقنيه النثر (Sprinkling technique) لعزل الفطريات الصائفة للنيما تود باستعمال وسط WA (Jansson and Jaffee, 1990)، حضرت اطباق حاويه على وسط WA، اخذت كميته (0.5-1 غم) تربة من كل عينة ونثرت فوق سطح الوسط بصورة متجانسة قدر الإمكان لكي يسهل ملاحظة النيما تود المصطاد وأدوات الاصطياد وقد حضرت مكررين لكل عينة، حضنت الاطباق بدرجة حرارة 25±2م° وفحصت الاطباق يوميا بعد مرور خمسة أيام من الحضن.

**5-2: فحص الفطريات وتشخيصها****Fungal examination and identification**

فحصت الاطباق المزروعة الحاوية على عينات التربة بعد خمسة أيام من الحضن بشكل يومي تحت المجهر الضوئي لملاحظة الفطريات الصائفة للنيما تود وبعد تمييز الفطريات ينقل جزء من المستعمرة الفطرية بواسطة ناقل الى شريحة زجاجية حاوية على قطرة من صبغة اللاكتوفينول الزرقاء (Blue-lactophenol) وشخصت الأنواع الفطرية الصائفة للنيما تود بالاعتماد على نوع وشكل أدوات الاصطياد والصفات المظهرية للكونيدات والحوامل الكونيدية، كما تم اخذ صور فوتوغرافية لها، واعتمدت عدة مفاتيح تصنيفية في تشخيص الفطريات المعزولة (قاسم، 2006; Zhang and Hyde, 2014).

**6-2: تحضير المزارع النقية للفطريات****Preparation of Pure Fungal Cultures**

حضرت مزارع نقية للفطريات الصائفة للنيما تود المعزولة باستعمال اطباق زجاجية حاوية على وسط CMA، نقلت اليها كونيدات كل فطر عند ظهورها في الاطباق الحاوية على عينات التربة باستعمال قضيب زجاجي ذي نهاية شعيرية وتحت المجهر الضوئي، وللغرض نفسه حضرت مزارع مائلة (Slant Cultures) حيث تم تلقيحها بجزء من المستعمرة النقية وحضنت لمدة 6 أيام في الحاضنة بدرجة حرارة 25±2م°، ثم حفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4م° لاستخدامها عند الحاجة إليها.

## 7-2: استخدام الفطريات الصائدة للنيما تود

استعملت الفطريات المذكورة في جدول (2-3) التي تم الحصول عليها من عملية العزل في إجراء جميع التجارب التي نفذت في هذه الدراسة.

جدول (2-3) الفطريات الصائدة للنيما تود المستخدمة في التجارب.

اسم الفطر	ت
<i>Arthrobotrys oligospora</i> (Ao)	1
<i>A.conoides</i> (Ac)	2
<i>A.eudermata</i> (Ae)	3
<i>A.thaumasia</i> (At)	4
<i>A.microcaphoides</i> (Am)	5
<i>A.cookedickison</i> (Ack)	6
<i>Clonostachys rosea</i> (Cr)	7

8-2: اختبار التضاد بين الفطرين الاحيائيين *T.harzianum* و *T.viride*

## والفطريات الصائدة للنيما تود في الوسطين الزراعيين CMA و PDA

تم الحصول على الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* والبكتريا *P.fluorescens* من قبل ا.م.د. ضياء سالم الوائلي (قسم وقاية نبات/ كلية الزراعة/ جامعة البصرة)، لغرض تحديد القابلية التضادية بين الفطرين الاحيائيين *T.harzianum* و *T.viride* (كلا على حدا) والفطريات الصائدة للنيما تود استعملت طريقة الزرع المزدوج اذ قسم طبق بتري حاوي على الوسط PDA و CMA (كلا على حدا) المعقم الى قسمين متساويين ثم لقع مركز القسم الأول من الطبق بقرص 5ملم اخذ بالقرب من حافة مستعمرة حديثه للفطر *T.harzianum* و *T.viride* بعمر 4 أيام ولقع القسم الثاني بقرص مماثل من مستعمرة احد الفطريات الصائدة للنيما تود بعمر 7 أيام كما أضيفت معاملة مقارنة استخدم فيها احد فطري المقاومه وذلك بتلقيح مركز الطبق الذي يحتوي على الوسط (PDA و CMA) المعقم. نفذت التجربة بثلاث مكررات لكل معاملة وحضنت الاطباق تحت درجة حرارة 25 °م. وحسبت درجة التضاد بعد وصول نمو مستعمرة الفطر المضاد في معاملة السيطرة الى حافة الطبق وفق مقياس (Bell et al., 1982) المكون من خمس درجات.

1- الفطر المضاد يغطي كل الطبق بما فيه الفطر الثاني.

- 2- الفطر المضاد يغطي ثلثي الطبق.
- 3- الفطر المضاد يغطي نصف الطبق.
- 4- الفطر المضاد يغطي ثلثي الطبق.
- 5- الفطر المضاد يغطي كل الطبق.

ويعد الفطر المضاد فعالاً إذا كانت درجة التضاد 1 او 2.

بما ان افضل وسط لنمو الفطريات الصائدة للنيما تود CMA وان وسط PDA هو الوسط الملائم لنمو الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* لذا ارتئينا ان نستخدم كلا الوسطين في اجراء هذه التجربة .

## 9-2: دراسة تأثير روائح الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* في نمو الفطريات

### للصائدة للنيما تود

حضر 250مل من الوسط الغذائي السائل PDB ووضع في دوارق سعة 250مل ثم عقم الوسط، وبردت الدوارق ولقح كل دوارق بقرصين قطر 5 ملم من الفطر *T.harzianum* و *T.viride* (كلا على حدا) الناميان على الوسط PDA بعمر اربعة أيام، ثم حضنت الدوارق في حاضنة هزازة 120 دورة/دقيقة وتحت درجة حرارة  $27 \pm 2$  °م لمدة 10 أيام، ثم رشحت المزارع الفطرية النامية خلال ورق ترشيح نوع Whatman No.1 ثم اعيد الترشيح باستعمال ورق ترشيح Millipore filter قطر ثقوبه 0.22 ملي مايكرومتر وباستخدام جهاز التفريغ الكهربائي (Vacuum) وذلك لتنقية الراشح الفطري بعد ذلك حضرت سلسله تراكيز وهي 10 و 20 و 30 % من راشح الفطر *T.harzianum* و *T.viride* الخام وبثلاثة مكررات بإضافتها الى الوسط CMA المعقم قبل التصليب مع مراعاة تعديل نسبه الاكار قبل تعقيم الوسط، صببت الأوساط الغذائية الحاوية على الراشح الفطري في اطباق بتري بلاستيكية ثم لقحت الأوساط بعد تصليبها بأقراص قطر كل منها 0.5 سم من مستعمرات الفطريات الصائدة للنيما تود النامية على الوسط CMA بعمر خمسة أيام في مركز كل طبق مع تلقيح اطباق حاوية على الوسط فقط بدون أي راشح كمعاملة سيطرة، حضنت الاطباق في الحاضنة تحت درجه حراره  $25 \pm 2$  °م، تم قياس معدل النمو الفطري بأخذ معدل قطرين متعامدين يمران بمركز الطبق بعد وصول نمو الفطر في احدى المعاملات أو معاملة السيطرة الى حافه الطبق (Madhi, 2013).

## 10-2: دراسة تأثير راشح البكتريا *P.fluorescens* في نمو الفطريات الصائفة للنيما تود

أخذ 250 مل من العالق البكتيري (حيث حضر من أخذ البكتريا بعمر 24 ساعة، وأضيفت إلى الوسط NB وكان عدد المستعمرات  $10^6$  CFU/ml مستعمرة بعد 48 ساعة من الحضانة)، النامي على الوسط Nutrient broth ووضع في دوارق سعة 250 مل ثم عقم الوسط ورشح بواسطة جهاز الطرد المركزي (Centrifugation) بمعدل 3000 دورة لمدة 15 دقيقة، ثم أعيد الترشيح باستعمال ورق ترشيح قطر ثقبه 0.22 ملي مايكرومتر باستخدام جهاز التفريغ الكهربائي (Vaccum) وحضرت سلسلة تراكيز وهي 10 و 20 و 30% وأضيفت إلى أطباق بتري تحتوي على الوسط CMA المعقم وبواقع ثلاثة مكررات وحركت الأطباق قبل تصلب الوسط حركه رحوية لتجانس انتشار الراشح البكتيري وبعد تصلب الوسط في هذه الأطباق لفتح مركز كل طبق بقرص قطره 0.5 سم أخذت بالقرب من حافة مستعمرة الفطريات الصائفة بعمر 7 أيام كما أضيفت معاملة سيطرة بتلقيح أطباق تحتوي على الوسط CMA فقط بالفطريات السبعة المختبرة، ثم حضنت الأطباق في الحاضنة تحت درجة حرارة  $25 \pm 2$  °م وبعد وصول النمو القطري في إحدى المعاملات في معاملة السيطرة إلى حافة الطبق تم قياس النمو الفطري بأخذ معدل قطرين متعامدين يمران بمركز الطبق .

## 11-2: دراسة تأثير رواشح الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* والبكتريا *P.fluorescens* في تكوين الكونيدات

تم حساب عدد الكونيدات في مستعمرات الفطريات الصائفة للنيما تود المعاملة في الفقرات 9.2 و 10.2 ولجميع التراكيز حيث أخذت ثلاثة مربعات مساحة كل منها 1 سم<sup>2</sup> بصورة عشوائية من المستعمرات الفطرية ووضعت في انبوبة اختبار حاوية على 2 مل من الماء المقطر ورجت بلطف ثم تم حساب عدد الكونيدات/مل باستخدام Haemocytometer لكل مكرر وباستخدام القانون التالي:

$$\text{No. of conidia/ml} = \text{No. of conidia} \times \text{Dilution} \times 50$$

ثم تم حساب عدد الكونيدات لكل 1 سم<sup>2</sup> باستخدام القانون التالي:

$$\text{No. of conidia/cm}^2 = \frac{\text{No. of conidia/ml}}{3}$$

**12-2: استخدام تقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) لتشخيص****عزلات الفطريات الصائدة للنيما تود****1-12-2: استخلاص DNA من عزلات الفطر**

أجريت تجارب ال Sequence في قسم وقاية النبات كلية الزراعة جامعة البصرة وتم تشخيص التتابعات في شركة التقانات الاحيائية الكورية (Macrogene Co., Korea) وجزء من التجربة اجري في مختبر الوراثة في قسم علوم الحياة كلية العلوم جامعة ميسان، تم استخلاص DNA من العزلات الفطرية باستخدام الكت Wizard® Genomic DNA (Promega) Purification Kit Cat. وحسب طريقة العمل الموضحة من قبل الشركة المصنعة.

**2-12-2: طريقة العمل لاستخلاص DNA**

1. تم الحصول على مزارع نقية للعزلات الفطرية على وسط CMA ثم وضعت الاطباق في الحاضنة لمدة 5 أيام، تم اتباع طريقة العمل باستخدام الكت (Promega).
2. قشطت الخلايا وتم تجميدها مع سائل التتروجين ووضعت في هاون خزفي معقم وطحنت جيدا ثم نقلت الخلايا الى انبوبة ابندروف معقمة Eppendorf tube 1.5 ml.
3. اضيف 600 µl Nuclei Lysis Solution ومزجها جيدا بواسطة جهاز (Vortex) لمدة 1-3 ثانية.
4. وضعت الانابيب في الحمام المائي Water bath بدرجة حرارة 65 °م لمدة 15 دقيقة.
5. اضيف 300 µl RNase Solution الى الخلايا ثم نقلها 2-5 مره، ويوضع الخليط في حمام مائي Water bath بدرجة حرارة 37°م لمدة 15 دقيقة، وتترك لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة للتبريد.
6. إضافة 200µl Protein Precipitation Solution وتمزج بشدة بواسطة جهاز (Vortex) لمدة 20 ثانية.
7. وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة 3 دقائق على سرعة 13,000-16,000.
8. نقل الطبقة العلوية التي تحتوي على DNA الى انبوبة ابندروف جديدة حاوية على 600µl من isopropanol.
9. مزج المحلول بواسطة جهاز الرجاج.
10. وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة دقيقة على سرعة 13,000-16,000.



11. نقلت الطبقة العليا الى انبوبة ابندروف جديدة و اضيف له 600µl 70% ethanol و قلبها لبعض الوقت لغسل DNA، وتوضع الانابيب في جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة دقيقة على سرعة 13,000-16,000.

12. نقوم بالتخلص من ethanol ونضيف DNA Rehydration Solution 100µl وتوضع الانابيب في حمام مائي Water bath بدرجة حرارة 65 C° لمدة ساعة.

13. تحفظ الانابيب الحاوية على DNA تحت التجميد بدرجة حرارة 20 C°- لحين الاستخدام.

### 2-12-3: قياس تركيز DNA بجهاز Nano Drop

تم قياس تركيز DNA لكل عينة بجهاز Nano Drop

### 2-12-4: التوصيل الكهربائي بهلام الاكاروز

#### 2-12-4-1: تحضير هلام الاكاروز Agarose-Gel-Electrophoresis

تم وزن 0.5 غم من مادة الاكاروز ووضعها في بيكر ثم إضافة 40 مل من محلول ( Tris Borate ) 1X TBe سخن المزيج بجهاز Microwave حتى الغليان حيث تذوب جميع دقائق الهلام بعد ذلك تم إضافة 0.1 مايكرو لتر من صبغة Ethidium Bromide ثم يترك لتتخفف درجة حرارته (50-60)°م.

#### 2-12-4-2: تحضير حوض الترحيل

تم غسل حوض الترحيل جيدا وربط المشط في الموقع المخصص له ووضع القطع المطاطية (ربلات) على حاقتي الحوض ثم صب محلول الهلام المحضر في الخطوة السابقة وترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة بعد ذلك تم رفع المشط والقطع المطاطية ووضع حوض الترحيل في الجار الرئيسي لجهاز الترحيل وغمر بمحلول 1 X TBE حتى يصل الى مسافة قليلة فوق سطح الهلام.

#### 2-12-4-3: الترحيل الكهربائي Electrophoresis

تم مزج 5 مايكرو لتر من DNA مع 2 مايكرو لتر من صبغة Bromophenol Blue ثم حقن المزيج في الحفرة وبعد انتهاء عملية الحقن ربطت الأقطاب الى جهاز القدرة وثبتت قوة التيار الكهربائي 75 فولت وترك الهلام لمدة 30 دقيقة لحين سريان الصبغة Bromophenol Blue من الحفر الى الجانب الاخر وبعد انتهاء الترحيل فحص الهلام بجهاز UV ملاحظة حزم DNA وتم تصويرها.

## 5-12-2: التشخيص الجزيئي لأنواع الفطريات الصائدة للنيما تود

في هذه الدراسة تم استخدام 7 أنواع من الفطريات الصائدة للنيما تود وذلك باستخدام ITS1 و ITS4 المجهز من شركة (White *et al.*, 1990) والموضح في الجدول (4-2).

جدول (4-2) تتابع البادئات ITS1 و ITS4 المستخدمة في تقنية PCR

Primers	Primers Sequence	Length
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3	19
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	20

جدول (5-2) المحاليل المستخدمة في التفاعل PCR باستخدام البادئات ITS1 و ITS4

Reagents	Volume ( $\mu$ L)
DNA template	10
Forward primer ITS1	2
Reverse primer ITS4	2
Master mix	25
Double distill water	11
Total volume	50

جدول (6-2) PCR المستخدم في تضخيم البادئات ITS1 و ITS4.

Steps	Temperature(C $^{\circ}$ )	Time	No .of cycles
Initial Denaturation	94	5 min	1
Denaturation	94	30 sec	35
Annealing	62	30 sec	
Extension	72	30 sec	
Final Extension	72	72 min	1

بعد انتهاء برنامج PCR تم وضع 4 مايكرو لتر من DNA Ladder(1000-100) bp في الحفرة الأولى و 5 مايكرو لتر من منتج PCR في الحفرة ثم رحل كهربائيا على هلام الاكاروز بوزن 0.3 غرام المذاب في محلول 1X TBE مع إضافة 0.1 مايكرو لتر من صبغة Ethidium bromide ثم تثبت قوة التيار على (60 V) في حوض الترحيل لمدة 1.5 ساعة بعد انتهاء فترة الترحيل تم فحص الهلام بجهاز UV وتصوير الحزم بالكاميرا. تم عمل شجرة وراثية وتتابع الاحماض الامينية.

## 13-2: انتاج الجسيمات النانوية من الفطريات المدروسة

1. تنمية الفطريات الصائدة للنيما تود على أوساط تخميرية:

تم انماء الفطريات المختبرة على وسط CMB المحضر مسبقا مع تعديل قيمة الاس الهيدروجيني pH=6.4 اذ لقت الدوارق الزجاجية سعة 500 مل الحاوية على 200 مل من الوسط المعقم بنقل 4 أقراص بقطر 5 ملم من مزارع الأنواع الفطرية النقية وحضنت جميع الدوارق بدرجة حرارة 25 °م لمدة 10 أيام (Sadowski *et al.*, 2008).

2. البناء الحيوي لجسيمات الفضة النانوية

بعد انتهاء فترة الحضان رشحت المزارع الفطرية باستخدام أوراق ترشيش نوع Whatman No.1 واستبعد الراشح الخام واخذ الغزل الفطري لكل فطر وغسل ثلاث مرات باستخدام ماء منزوع الايونات Deionized water المعقم لإزالة أي مكونات عالقة من الوسط ثم وزن عشر غرام من كل غزل فطري على أساس الوزن الرطب وبظروف معقمة واعيد تعليقها مع 100 مل ماء منزوع الايونات المعقم وحضنت جميع الدوارق في حاضنة هزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة عند درجة حرارة 25 °م لمدة 72 ساعة.

بعد انتهاء فترة الحضان رشحت المزارع الفطرية باستخدام أوراق ترشيش نوع Whatman No. 1 اخذ 100 مل من راشح المزارع الفطرية لكل فطر و اضيف اليه ملح نترات الفضة  $AgNO_3$  وذلك بوزن 0.017 غم وكما تركت 100 مل من راشح المزرعة دون إضافة نترات الفضة كمعاملة السيطرة وحضنت جميع الدوارق بدرجة حرارة 25 °م وبظروف مظلمة لمدة 72 ساعة (Karbasian *et al.*, 2008).

3. الكشف عن جسيمات الفضة النانوية بوساطة اختبار طيف الأشعة فوق البنفسجية-مرئية -UV-Visible spectrum

بعد ملاحظة التغيرات اللونية لراشح المزرعة الفطرية المعامل مع نترات الفضة تم اخذ 3مل من المحلول بعد 72 ساعة وفحص بجهاز المطيافية عند الاطوال الموجية (300-800)

نانومتر، وتم الفحص باستخدام جهاز (UV-1800) UV-Visible spectroscopy الموجود في جامعة ميسان كلية العلوم قسم الكيمياء.

4. فحص المجهر الالكتروني الماسح (SEM) Scan Electronic Microscope استخدم المجهر الالكتروني الماسح (اسم الجهاز: Fesem-Zies الماني المنشأ) لغرض تحديد شكل الجسيمات النانوية وتم تصوير العينات في جامعة شهيد بهشتي Shahid Beheshti University / طهران / جمهورية إيران الاسلامية.

## 14-2: تحضير لقاح البيوض ويرقات الطور الثاني لنيماتود العقد الجذرية

### *Meloidogyne sp.*

جمعت كميات مناسبة من جذور نبات الباميا *Abelmoschus esculentus L.* المصابة بنيماتود العقد الجذرية من مناطق مختلفة في محافظة ميسان ثم غسلت الجذور المصابة بعناية لغرض التخلص من التربة العالقة بها دون أكياس البيض، تم تقطيع الجذور الى قطع صغيرة 2-4 سم ثم وضعت في خلاط كهربائي Blander ووضعت كمية مناسبة من الماء المقطر مع إضافة مادة هايبيوكلورات الصوديوم NaOCl بتركيز 1% من المحلول التجاري، دور الخلاط لمدة دقيقتين ثم استمر الرج يدوياً لمدة دقيقتين أيضاً ثم وضعت محتويات الخلاط في مناخل Sieves تتراوح ثقوبها من 5ملم الى 38 مايكرومتر (400 mesh) تم جمع البيوض في الأخير وجرت عملية الغسل لعدة دقائق بماء الحنفية ثم ماء مقطر، واستعملت البيوض المستخلصة في إجراء التجارب ، أما الحصول على يرقات الطور الثاني فقد نقلت البيوض الى ورق حجم 250 مل واكمل الحجم بالماء المقطر، ثم حضنت البيوض في درجة حرارة 28 °م ولمدة 3-5 أيام لتفقس الى يرقات الطور الثاني (Hussey and Barker, 1973) وأجريت عملية تحضير بيوض ديدان العقد الجذرية في مختبرات قسم وقاية نبات/ كلية الزراعة – جامعة ميسان.

## 1-14-2: اختبار تأثير رواشح الفطريات الصائدة للنيماتود والفطرين

*T.harzianum* و *T.viride* والبكتريا *P.fluorescens* في فقس بيوض

### ديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

اضيف 1مل من عالق بيوض ديدان العقد الجذرية الى طبق بتري 5 سم حيث يحتوي كل واحد مل 20-25 بيضة واضيف لها 3 مل من الراشح الخام للفطريات الصائدة للنيماتود المختبرة وعملت بثلاث مكررات وعملت معاملة السيطرة والتي اضيف لها 3 مل ماء مقطر معقم فقط وحضنت الاطباق في حرارة 28م° وحسبت النسبة المئوية للبيض الفاقس بعد 24, 48, 72 ساعة،

اعيد هذا الاختبار باستخدام الفطريات *T.harzianum* و *T.viride* (كلا على حدا) والبكتريا *P. fluorescens* (الاسدي، 2009).

## 2-14-2: اختبار تأثير مزيج رواشح الفطريات الصائدة للنيماتود والفطر *T.harzianum* و *T.viride* في فقس بيوض ديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

اضيف 1مل من معلق بيوض الديدان الى طبق بتري 5 سم حيث يحتوي كل واحد مل 20-25 بيضة و اضيف لها 1.5 مل من الراشح الخام لاحد الفطريات الصائدة للنيماتود المختبرة و 1.5 مل من الراشح الخام للفطر *T.harzianum* و *T.viride* (كلا على حدا) و عملت بثلاث مكررات اما معاملة السيطرة فقد اضيف لها 3 مل ماء مقطر معقم فقط و حضنت الاطباق في حرارة 28 °م و حسبت النسبة المئوية للبيض الفاقس بعد 24, 48, 72 ساعة.

## 2-14-3: اختبار تأثير مزيج رواشح الفطريات الصائدة للنيماتود وراشح البكتريا *P.fluorescens* في فقس بيوض ديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

اضيف 1مل من معلق بيوض الديدان الى طبق بتري 5 سم حيث يحتوي كل واحد مل 20-25 بيضة و اضيف لها 1.5 مل من الراشح الخام لاحد الفطريات الصائدة للنيماتود المختبرة و 1.5 مل من راسح البكتريا *P. fluorescens* و عملت بثلاث مكررات مع عمل معاملة السيطرة والتي اضيف لها 3 مل ماء مقطر معقم فقط و حضنت الاطباق في حرارة 28 °م و حسبت النسبة المئوية للبيض الفاقس بعد 24, 48, 72 ساعة.

## 2-14-4: اختبار تأثير مزيج راسح البكتريا *P.fluorescens* والفطرين *T.harzianum* و *T.viride* في فقس بيوض ديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

اضيف 1مل من معلق بيوض الديدان الى طبق بتري 5 سم حيث يحتوي كل واحد مل 20-25 بيضة و اضيف لها 1.5 مل من الراشح الخام للبكتريا *P. fluorescens* و 1.5 مل من الراشح الخام للفطر *T.harzianum* و *T.viride* (كلا على حدا) و عملت بثلاث مكررات مع معاملة السيطرة والتي اضيف لها 3 مل ماء مقطر معقم فقط و حضنت الاطباق في حرارة 28 °م و حسبت النسبة المئوية للبيض الفاقس بعد 24, 48, 72 ساعة.

2-14-5: اختبار تأثير مزيج رواشح الفطريات الصائدة للنيماتود والفطرين *T.harzianum* و *T.viride* والبكتريا *P.fluorescens* في فقس بيوض

#### ديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

اضيف 1مل من معلق بيوض الديدان الى طبق بتري 5 سم حيث يحتوي كل واحد مل 20-25 بيضة و اضيف لها 1 مل من الراشح الخام لاحد الفطريات الصائدة للنيماتود المختبرة و 1 مل من راشح البكتريا *P.fluorescens* و 1 مل من الراشح الخام للفطر *T.harzianum* أو *T.viride* وعملت بثلاث مكررات مع معاملة السيطرة والتي اضيف لها 3 مل ماء مقطر معقم فقط وحضنت الاطباق في حرارة 28 °م وحسبت النسبة المئوية للبيض الفاقس بعد 24, 48, 72 ساعة.

2-14-6: اختبار تأثير رواشح الفطريات الصائدة للنيماتود والفطرين *T.harzianum* و *T.viride* والبكتريا *P.fluorescens* على يرقات الطور

#### الثاني لديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

اضيف 1مل من مزرعة يرقات الطور الثاني بعمر 3-5 أيام الى طبق بتري 5 سم حيث يحتوي كل واحد مل 20-25 يرقة و اضيف لها 3 مل من أحد الرواشح الخام للفطريات الصائدة للنيماتود وعملت بثلاث مكررات مع معاملة السيطرة والتي اضيف لها 3 مل ماء مقطر معقم فقط وحضنت الاطباق في حرارة 28 °م وحسبت اليرقات الميتة بعد 24, 48, 72 ساعة، وفق الاتي:

1. استقامة اليرقات وعدم وضوح الرمح فيها إضافة الى تغير لونها الى اللون البني.
2. فقدانها للقدرة على الحركة عند لمسها بالإبرة.
3. انتفاخ اليرقات وكبر حجمها.

حيث اعيد هذا الاختبار باستخدام الفطريات *T.harzianum*، *T.viride* (كلا على حدا)، والبكتريا *P.fluorescens* (الاسدي، 2009).

2-14-7: اختبار تأثير مزيج رواشح الفطريات الصائدة للنيماتود والفطرين *T.harzianum* و *T.viride* على يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية

#### *Meloidogyne sp.*

اضيف 1مل من مزرعة يرقات الطور الثاني بعمر 3-5 أيام الى طبق بتري 5 سم حيث يحتوي كل واحد مل 20-25 يرقة و اضيف لها 1.5 مل من الراشح الخام لاحد الفطريات الصائدة للنيماتود و 1.5 مل من الراشح الخام للفطر *T.harzianum* و *T.viride* (كلا على حدا) وعملت

بثلاث مكررات مع معاملة السيطرة والتي اضيف لها 3 مل ماء مقطر معقم فقط وحضنت الاطباق في حرارة 28 °م وحسبت اليرقات الميتة بعد 24, 48, 72 ساعة، كما في الفقرة 6.14.2.

#### 2-14-8: اختبار تأثير مزيج رواشح الفطريات الصائدة للنيماتود والبكتريا

*P. fluorescens* على يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية

##### *Meloidogyne sp.*

اضيف 1مل من مزرعة يرقات الطور الثاني بعمر 3-5 أيام الى طبق بتري 5 سم حيث يحتوي كل واحد مل 20-25 يرقة واضيف لها 1.5 مل من الراشح الخام لاحد الفطريات الصائدة للنيماتود و1.5 مل من الراشح الخام للبكتريا *P. fluorescens* وعملت بثلاث مكررات مع معاملة السيطرة والتي اضيف لها 3 مل ماء مقطر معقم فقط وحضنت الاطباق في حرارة 28 °م وحسبت اليرقات الميتة بعد 24, 48, 72 ساعة، كما في الفقرة 6.14.2.

#### 2-14-9: اختبار تأثير مزيج راشح البكتريا *P. fluorescens* والفطرين

*T. viride* و *T. harzianum* على يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية

##### *Meloidogyne sp.*

اضيف 1مل من مزرعة يرقات الطور الثاني بعمر 3-5 أيام الى طبق بتري 5 سم حيث يحتوي كل واحد مل 20-25 يرقة واضيف لها 1.5 مل من الراشح الخام للبكتريا *P. fluorescens* و1.5 مل من الراشح الخام للفطر *T. harzianum* و *T. viride* (كلا على حدا) وعملت بثلاث مكررات مع معاملة السيطرة والتي اضيف لها 3 مل ماء مقطر معقم فقط وحضنت الاطباق في حرارة 28 °م وحسبت اليرقات الميتة بعد 24, 48, 72 ساعة، كما في الفقرة 6.14.2.

#### 2-14-10: اختبار تأثير مزيج رواشح الفطريات الصائدة للنيماتود

والفطرين *T. harzianum* و *T. viride* والبكتريا *P. fluorescens* على

##### يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية. *Meloidogyne sp.*

اضيف 1مل من مزرعة يرقات الطور الثاني بعمر 3-5 أيام الى طبق بتري 5 سم حيث يحتوي كل واحد مل 20-25 يرقة واضيف لها 1مل من الراشح الخام لاحد الفطريات الصائدة للنيماتودا و 1مل من الراشح الخام للبكتريا *P. fluorescens* و1مل من الراشح الخام للفطر *T. harzianum* و *T. viride* (كلا على حده) وعملت بثلاث مكررات مع معاملة السيطرة والتي اضيف لها 3 مل ماء مقطر معقم فقط وحضنت الاطباق في حرارة 28 °م وحسبت اليرقات الميتة بعد 24, 48, 72 ساعة، كما في الفقرة 6.14.2.

## 15-2: التحليل الاحصائي Statistical Analysis

اختير التصميم العشوائي الكامل (CRD) Complete Randomized Design واختبار اقل فرق معنوي المعدل (LSD) Least Significant Difference تحت مستوى ثقة  $P < 0.05$  (الراوي، 1980) لإيجاد الفروقات المعنوية بين في الاختبارات المختلفة وأجري التحليل الإحصائي من قبل الدكتور اسعد يحيى عايد جامعة البصرة-كلية الزراعة-قسم الإنتاج الحيواني.



# الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

*Result & Discussion*

3-1: وصف الأنواع التي سجلت لأول مرة في العراق

*Arthrobotrys cookedickinson* (Cooke & Dickinson) Yu, 1-1-3  
comb. nov. ≡ *Monacrosporium cystosporum* Cooke &  
Dickinson, Trans. Br. Mycol. Soc. 48: 623 (1965)

المستعمرات شفافة، الخيوط الفطرية شفافة، مقسمة، متفرعة، سمكها 2.5-6 مايكرومتر،  
الحوامل الكونيدية شفافة، مقسمة، غير متفرعة، قائمة، الحواجز 8-11 حاجز، طولها 40-60  
مايكرومتر، سمكها 5-7.5 مايكرومتر عند القاعدة، اما عند القمة 3-5 مايكرومتر، يحمل كونيديه  
واحدة. الكونيدات شفافة، شكلها بصورة عامة مغزليه او زورقية الشكل، ابعادها 15-22.5×30-  
52.5 مايكرومتر، الحواجز 1-3 معظمها 2-3 حاجز، نهاية الخلية مستديرة، ويكون هذا الفطر  
ابواغ كلاميديية (Chlamydo spores).

وسيلة الاصطياد هي الشباك اللاصقة ثلاثية الابعاد.

هذا الفطر كان يصنف ضمن جنس *Monacrosporium* الا ان التصنيف الحديث بالاعتماد  
على تقنيه PCR ولأنه يكون شبك لاصقة Adhesive Nets نقل الى الجنس *Arthrobotrys*،  
يوجد تشابه بين هذا النوع والنوع *A. eudermata* الا ان كونيدات الفطر *A. eudermata* تكون  
اكبر وعموما يتفق وصف هذه العزلة مع ما ذكره (Yu et al., 2014).

*Arthrobotrys microscaphoides* (Liu & Lu) M. Scholler, :2-1-3  
Hagedorn & A. Rubner, Sydowia 51 (1): 103 (1999)  
≡ *Monacrosporium microscaphoides* Xing Z. Liu & B.S.  
Lu, Mycosystema 6: 68 (1993)

المستعمرات شفافة، منتشر، الخيوط الفطرية شفافة، مقسمة، متفرعة، الحوامل الكونيدية  
شفافة، قائمة، مقسمة، غير متفرعة او متعددة التفرع عند القمة، طولها 230-460 مايكرومتر،  
وسمكها 3-5 مايكرومتر عند القاعدة، 2-5.2 مايكرومتر عند القمة، يحمل 1-3 كونيديه، الكونيدية  
شفافة، مغزلية الشكل، 0-3 حاجز، اغلبها 2 حاجز، ابعادها 10-20×22.5-45 مايكرومتر، يكون  
هذا الفطر ابواغ كلاميديية Chlamydo spores.

وسيلة الاصطياد هي الشباك اللاصقة ثلاثية الابعاد.

هذا الفطر كان يصنف ضمن جنس *Monocrosporium* الا ان التصنيف الحديث بالاعتماد على تقنيته PCR ولأنه يكون شبك لاصقة Adhesive Nets نقل الى الجنس *Arthrotrys* (Liu & Lu et al., 1999).

***Arthrotrys rutgeriense* (Cooke & Pramer) Yu, :3-1-3  
comb.nov  $\equiv$  *Monacrosporium rutgeriense* R.C. Cooke  
&Pramer, [as 'rutgeriensis']Phytopathology 58:544, 1968**

المستعمرات شفافة، الخيوط الفطرية شفافة، مقسمة، متفرعة، الحوامل الكونيدية شفافة، قائمة، غير متفرعة او تكون متفرعة عند القمة، مقسمة، طولها 67.5-350 مايكرومتر، و سمكها 3-8 مايكرومتر عند القاعدة، 2-3 مايكرومتر عند القمة، يحمل كونيده او كونيدتان، الكونيده شفافة، شكلها كروي او مغزليه الشكل، ابعادها 17.5- 27.5×27.5-47.5 مايكرومتر، تحتوي على 2-3 حواجز.

وسيلة الاصطياد هي الشباك اللاصقة ثلاثية الابعاد.

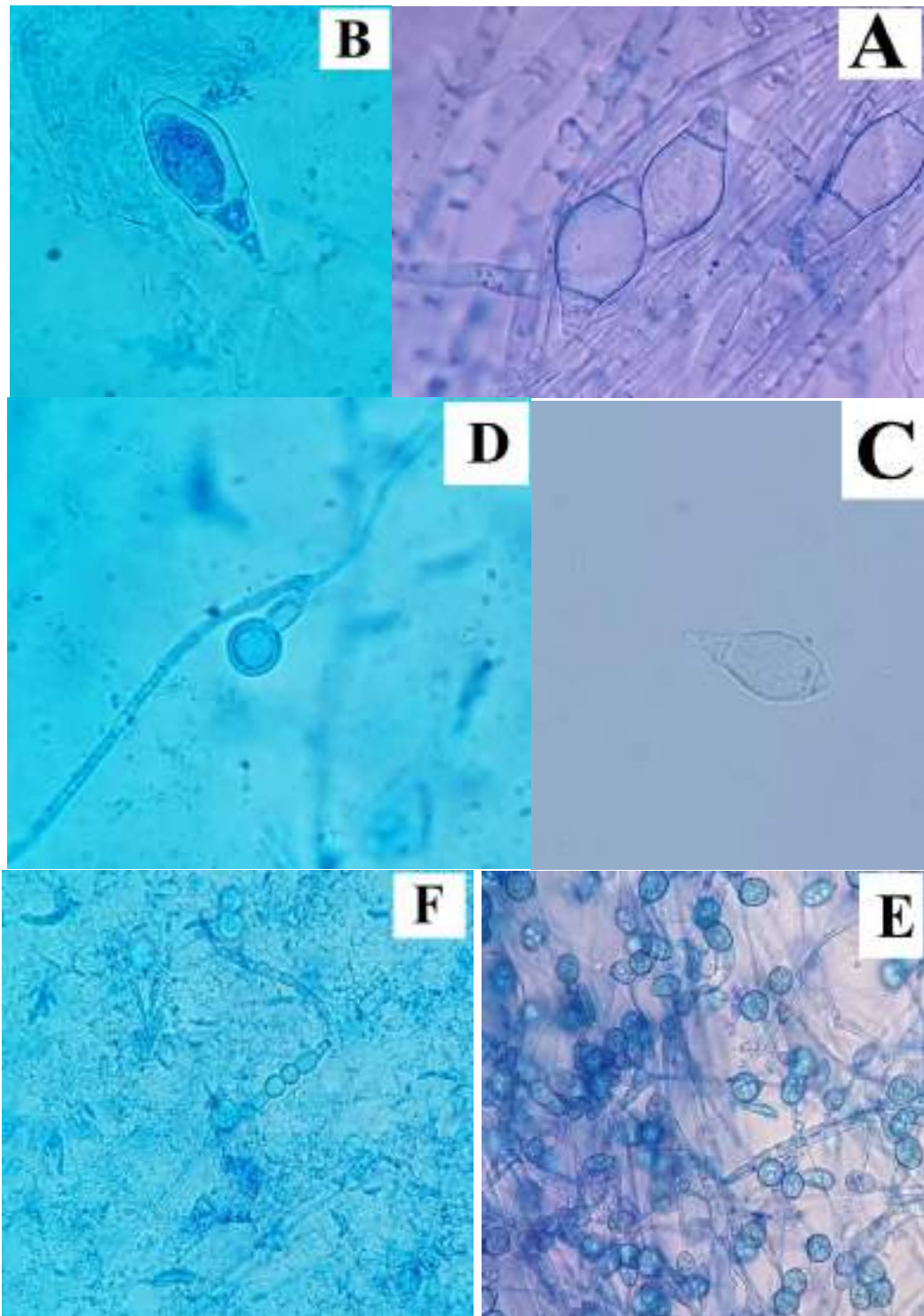
هذا الفطر كان يصنف ضمن جنس *Monocrosporium* الا ان التصنيف الحديث بالاعتماد على تقنيته PCR ولأنه يكون شبك لاصقة Adhesive Nets نقل الى الجنس *Arthrotrys*، وان الفطر *Arthrotrys rutgeriense* يشبه الفطر *A. eudermata* ولكن يختلف في حجم الكونيدة وعموما ويتفوق وصف هذه العزلة مع ما ذكره (Cooke and Pramer 1968).

***Clonostachys rosea* (Link) Schroers, (1999) Samuels, :4-1-3  
comb. nov.  $\equiv$  *Penicillium roseum* *Mycologia*. 81 (2): 365–**

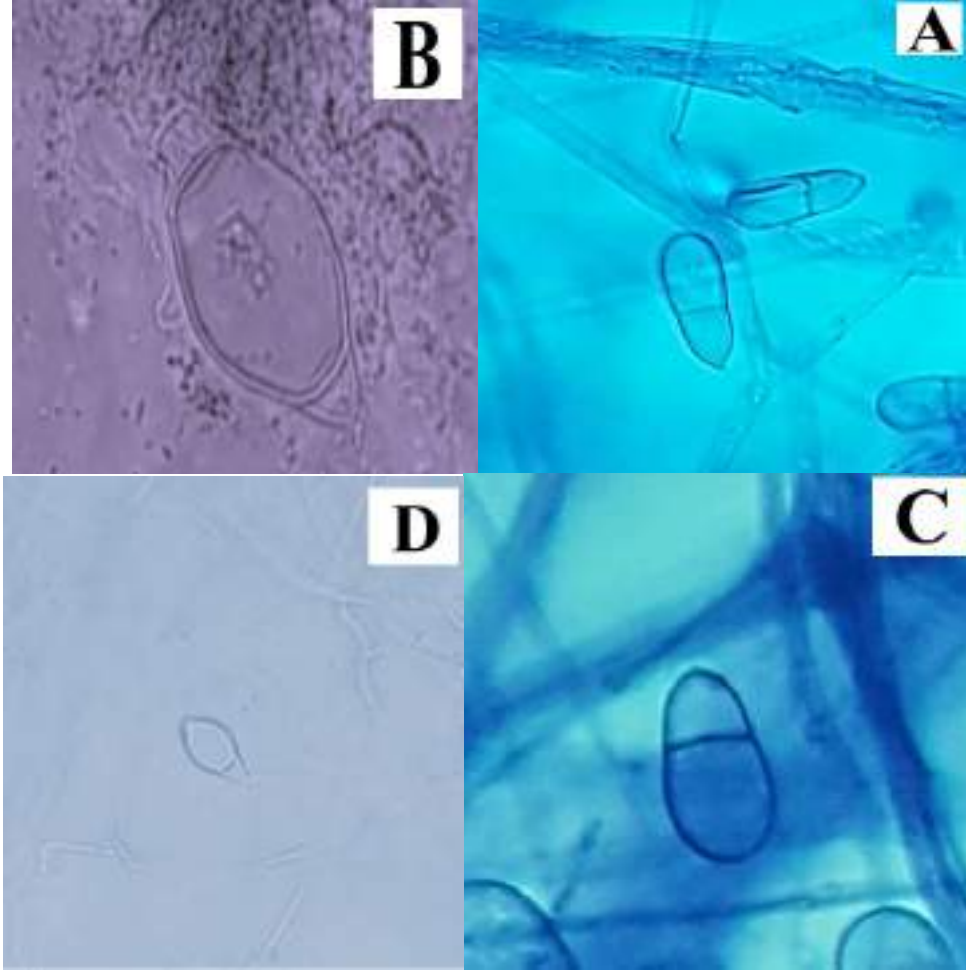
**385**

المستعمرات شفافة، الخيوط الفطرية شفافة، متفرعة، مقسمة، منتشرة، الحوامل الكونيدية شفافة، طولها 160-370 مايكرومتر، وسمكها 1.5- 3.4، يكون 1-4 كونيده، الكونيده شفافة، شكلها كروي او بيضوي، ابعادها 1.9-4.8×3.2-15.4 مايكرومتر، تكون ابواغ كلاميديه *Chlamydospores*.

وسيلة الاصطياد هي الشباك اللاصقة ثلاثية الابعاد (Schroers et al., 1999).



شكل (1-3) يوضح اشكال الكونيدات للفطرين *A. cookedicksonii*:A، *A. microsaphoides*:B، *A. rutgeriense*:C و *A. rutgeriense*:D و *C. rosea*:E والـ *Chlamydosporium* للفطر *C. rosea*:F



شكل (2-3) يوضح اشكال الكونيدات للفطريات الصائدة للنيما تود A: *A. conoides* ، B: *A. eudermata* ، C: *A. oligospora* ، D: *A. thaumasia*.

### 2-3: عزل وتشخيص الفطريات الصائدة للنيما تود

تم عزل وتشخيص 12 نوع من الفطريات المهلكة للنيما تود 9 منها تعود الى إلى ثلاث أجناس. وسجلت الانواع الفطرية *A. cookedickison* و *A. microscaphoides* و *A. rosea* و *rutgeriense* لأول مرة في العراق وعزلت أيضاً 3 أنواع من الفطريات المتطفلة داخليا تعود الى الجنسين *Meristacrum* و *Harposporium* جدول (1-3).

ان نتائج هذه الدراسة تتفق مع الكثير من الدراسات التي تؤكد على ان الفطريات المهلكة للنيما تود شائعة الانتشار في معظم بقاع العالم وخصوصا في الترب الزراعية، Herrera et al., (2016) التي تكون غنية بالفطريات المهلكة للنيما تود (Hay et al., 2002)، وأشار قاسم (1997، 2006) الى ان الترب العراقية في وسط وجنوب العراق غنية بهذه الفطريات وخصوصا الترب الزراعية.

جدول (1-3) أنواع الفطريات المهلكة للنيماتود المعزولة وأنواع أدوات الاصطياد التي تكونها.

Nematophagous Fungi	Adhesive Traps
Nematode Trapping Species	
<i>Arthrobotrys conoides</i>	Adhesive Nets
<i>A.cookedickison</i>	Adhesive Nets
<i>A.eudermata</i>	Adhesive Nets
<i>A.microscaphoides</i>	Adhesive Nets
<i>A.oligospora</i>	Adhesive Nets
<i>A.thaumasia</i>	Adhesive Nets
<i>A.rutgeriense</i>	Adhesive Nets
<i>Clonostachys rosea</i>	Adhesive Nets
<i>Drechslerella brochopaga</i>	Constricting Ring
Endoparasitic Species	
<i>Harposporium anguillulae</i>	Ingested Conidia
<i>H. helicoides</i>	Ingested Conidia
<i>Meristacrum asterospermum</i>	Adhesive Conidia

### 3-3: القدرة التضادية لفطري المقاومة الحيوية *T.harzianum* و *T.viride*

#### والفطريات الصائدة للنيماتود في الوسطين الزراعيين CMA و PDA

أظهرت نتائج اختبار التضاد بين جميع الفطريات المدروسة بوجود تضاد بين كل من الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* (كلا على حدا) والفطريات الصائدة للنيماتود المدروسة ولوحظ من خلال الفحص بالمجهر الضوئي انه لا يوجد تثبيط بينها أي أن الخيوط الفطرية للفطرين *T.harzianum* و *T.viride* والفطريات الصائدة للنيماتود المختبرة لا تفرز مواد محله للخيوط الفطرية لها ولم يلاحظ أي تطفل فطري بين هذه الفطريات ، ولوحظ أيضا ان الفطر *T.harzianum* له تضاد ضد الفطريات المختبرة أفضل من الفطر *T.viride* ، بينت الدراسة ان الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* لهما درجة تضاد 1، 2، 3، حسب مقياس Bell et al., (1982).

وجد ان الفطر *T.harzianum* كانت درجة تضاده 1 مع الفطر *A.conoides* وعلى الوسطين CMA و PDA (شكل 3-4 A و B)، كذلك الفطر *A.thaumasia* على الوسط CMA (شكل 3-5 E)، اما الفطر *T.viride* كانت درجة تضاده 1 مع الفطر *A.eudermata* على الوسط PDA (شكل 3-7 B)، اما الفطر *T.harzianum* كانت درجة تضاده 3 مع الفطريات *A.cookedickison* و *A.microscaphoides* و *C.rosea* على الوسط PDA (الاشكال 3-4

D و B 6-3 و B 7-3) على التوالي، والفطر *T.viride* كانت درجة تضاده 3 مع الفطر *A.thaumasia* على الوسط CMA (شكل 8-3 A)، كانت اكثر درجة تضاد هي 2 لأغلب الفطريات المدروسة مع الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* على الوسطين CMA و PDA (جدول 2-3).

لوحظ انه لا يوجد اختلاف واضح بين الوسطين الزرعيين CMA و PDA عند دراسة تأثير التضاد بين الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* والفطريات الصائدة للنيما تود المدروسة ماعدا الفطر *A.eudermata* كانت درجة تضاده 1 على الوسط PDA واصبحت 2 على الوسط CMA وكذلك الفطر *A.thaumasia* كانت درجة تضاده 2 على الوسط PDA واصبحت 3 على الوسط CMA مع الفطر *T.viride*، اما الفطر *A.thaumasia* مع الفطر *T.harzianum* كانت درجة تضاده 2 على الوسط PDA واصبحت 1 على الوسط CMA.

اشارت الدراسات ان الفطر *Trichoderma* يعمل ضد الفطريات الممرضة ويستخدم ثلاث آليات تأثير وهي التطفل الفطري - الفطري (Mycoparasitism) والتضاد الحيوي (Antibiosis) والتنافس (Competition) (Reino et al., 2008).

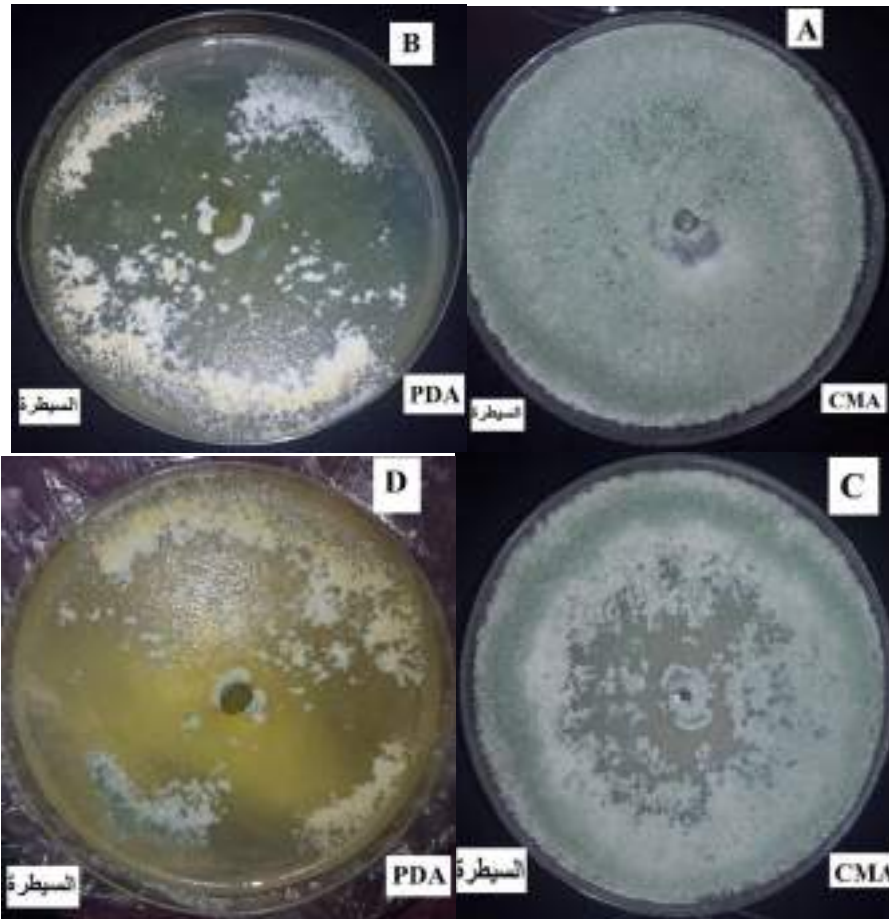
واشار الساعدي (2011) ان الفطر *Trichoderma* يتصف بسهولة عزلة وسرعة نموه ولا يحتاج الى متطلبات غذائية خاصة، بحيث ينمو خلال 4 أيام او اقل. بينما الفطريات الصائدة للنيما تود تحتاج الى فترة 7 أيام او أكثر وقد تصل الى أكثر من 10 أيام كما في الفطر *Drechlerella brochopaga* (قاسم، 1997). في هذه الدراسة وجد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

ذكر (Szabó, 2014) من خلال دراسته للتضاد الفطري بين عزلات عديدة لأنواع الفطر *Trichoderma* وبعض الفطريات الصائدة للنيما تود مثل *Monacrosporium cionobagum* بعد 3 أسابيع من الحضن لم تستطيع 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 وجود تماس قليل بين عزلات الفطر *T.harzianum* والفطريات الصائدة للنيما تود.



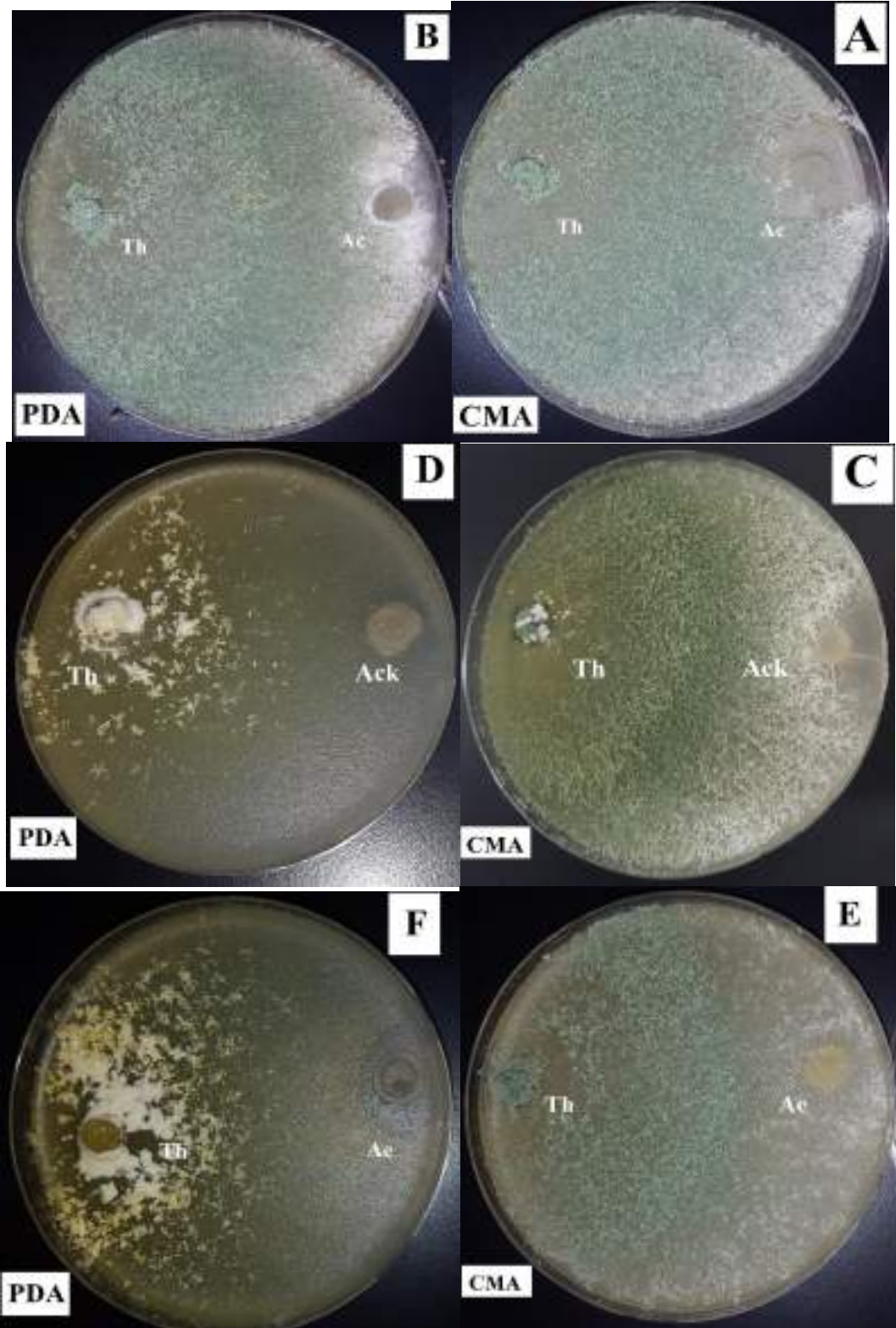
جدول (2-3) يوضح درجة التضاد بين الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* والفطريات الصائدة للنيما تود المدروسة على الوسطين الزرعيين CMA و PDA حسب مقياس (Bell et al., 1982).

<i>T.viride</i>		<i>T.harzianum</i>		الفطريات الصائدة للنيما تود
PDA	CMA	PDA	CMA	
2	2	1	1	<i>A.conoides</i>
2	2	3	2	<i>A.cookedickison</i>
1	2	2	2	<i>A.eudermata</i>
2	2	3	2	<i>A.microscaphoides</i>
2	2	2	2	<i>A.oligospora</i>
2	3	2	1	<i>A.thaumasia</i>
2	2	3	2	<i>C.rosea</i>

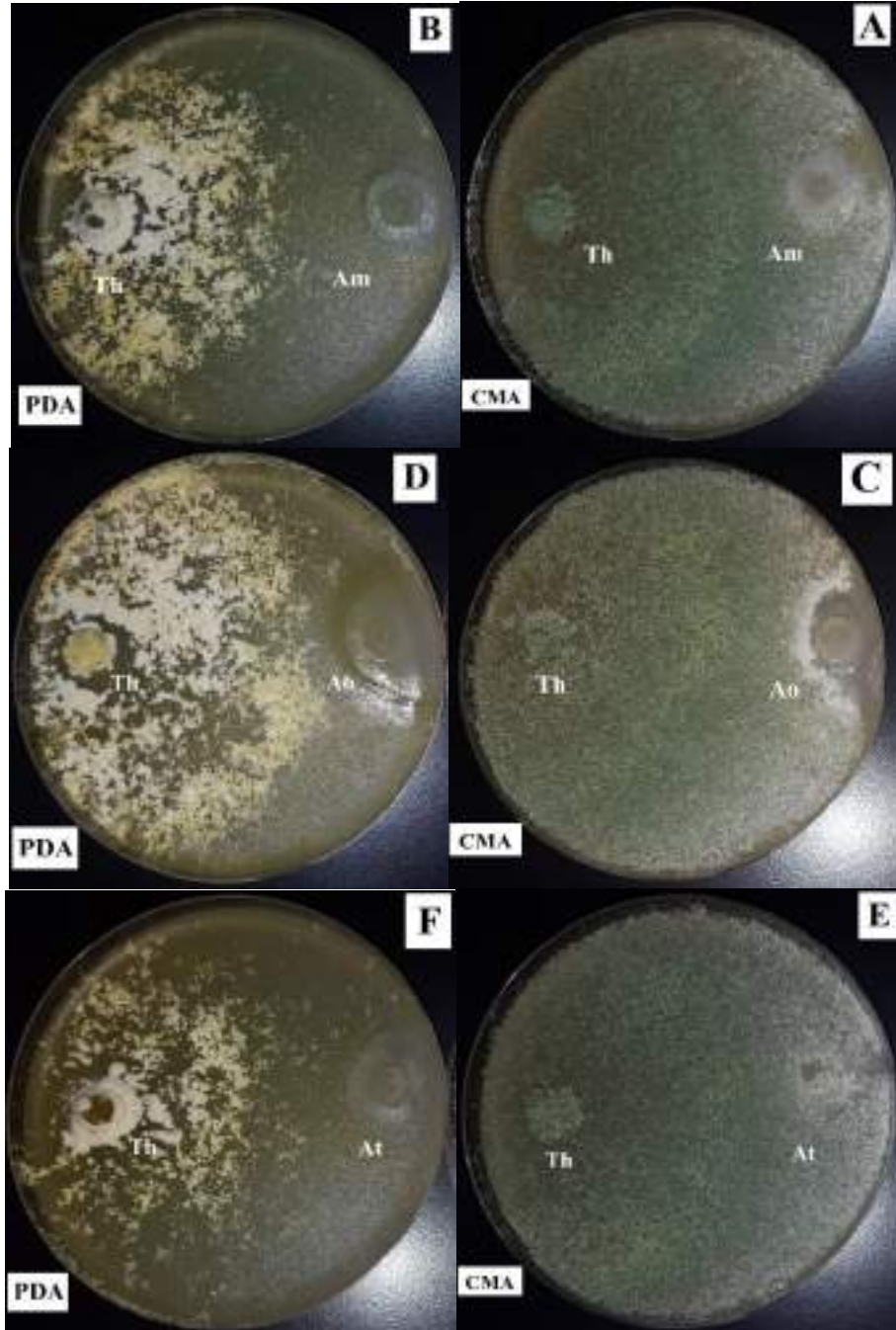


شكل (3-3) معاملة السيطرة A و B للفطر *T.harzianum* و C و D للفطر *T.viride* في الوسطين الزرعيين CMA و PDA (بعمر أربعة ايام).



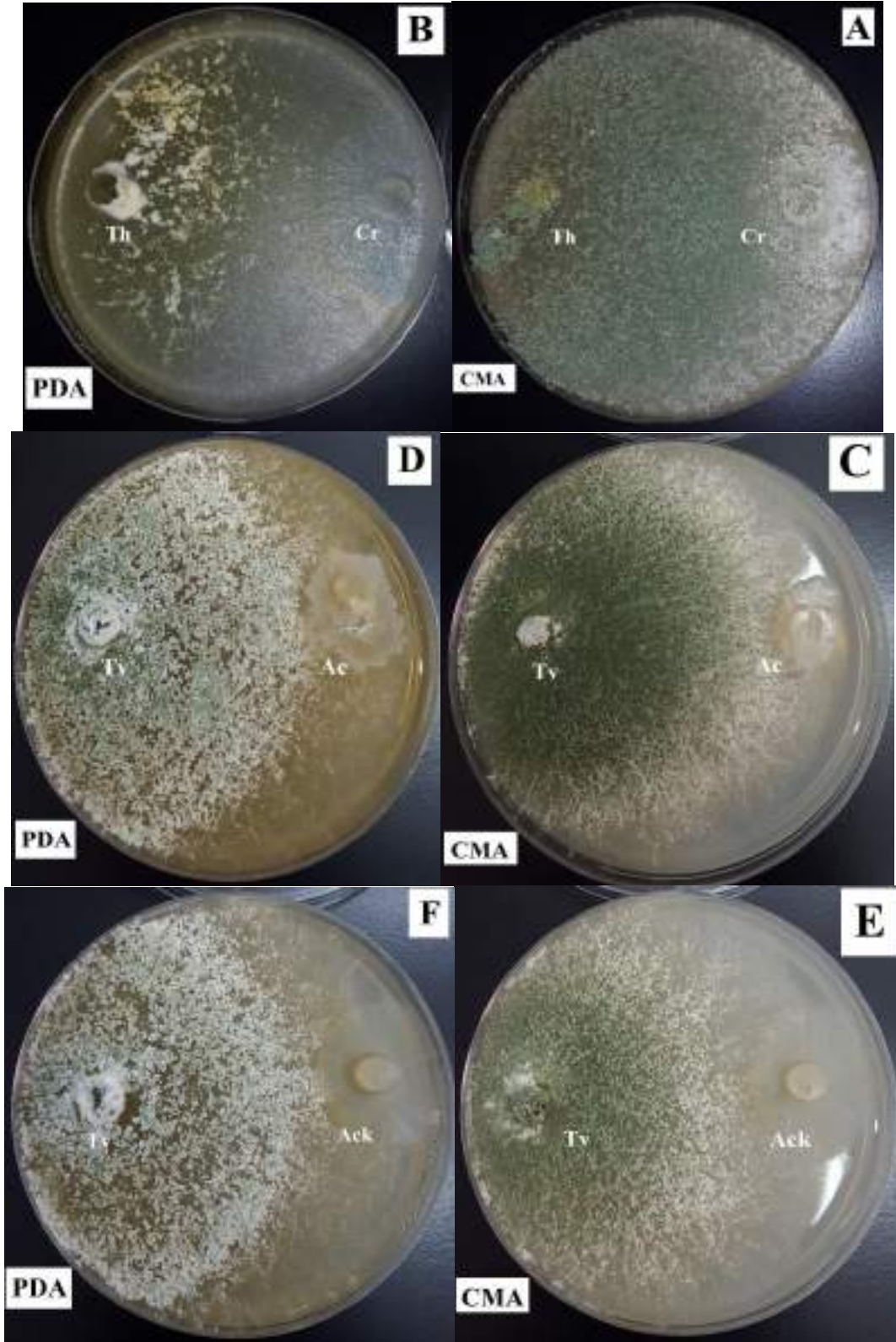


شكل (3-4) التضاد بين الفطر *T.harzianum* والفطريات الصائدة للنيما تود على الوسطين CMA و PDA، A، و B ضد الفطر *A.conoides*، C و D ضد الفطر *A.cookedickison*، E و F ضد الفطر *A.eudermata*

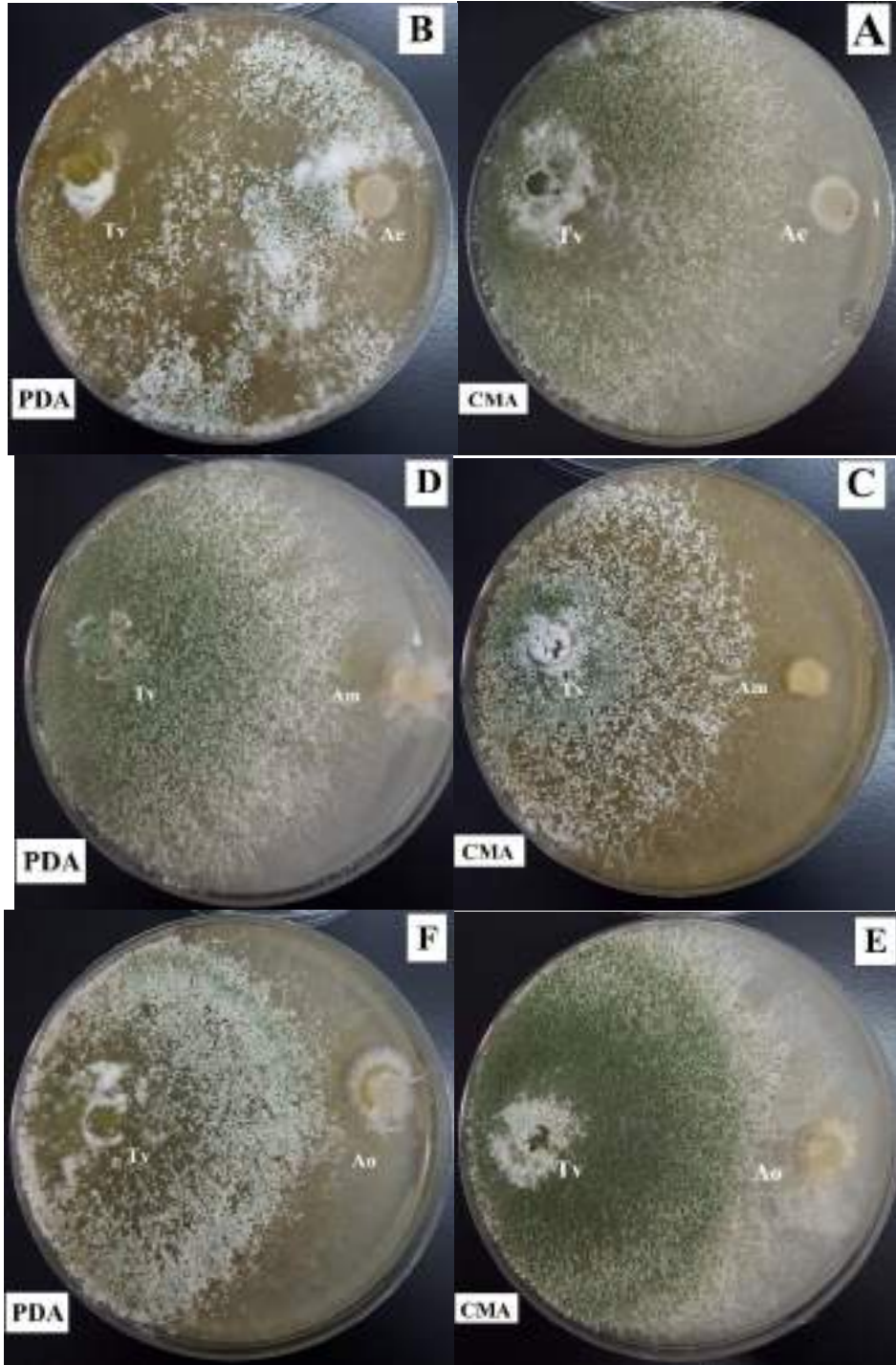


شكل (3-5) التصادم بين الفطر *T.harzianum* والفطريات الصائدة للنيما تود على الوسطين PDA و CMA ،  
 B و A ضد الفطر *A.microscaphoides* ، C و D ضد الفطر *A.oligospora* ، E و F ضد الفطر  
*A.thaumasia*

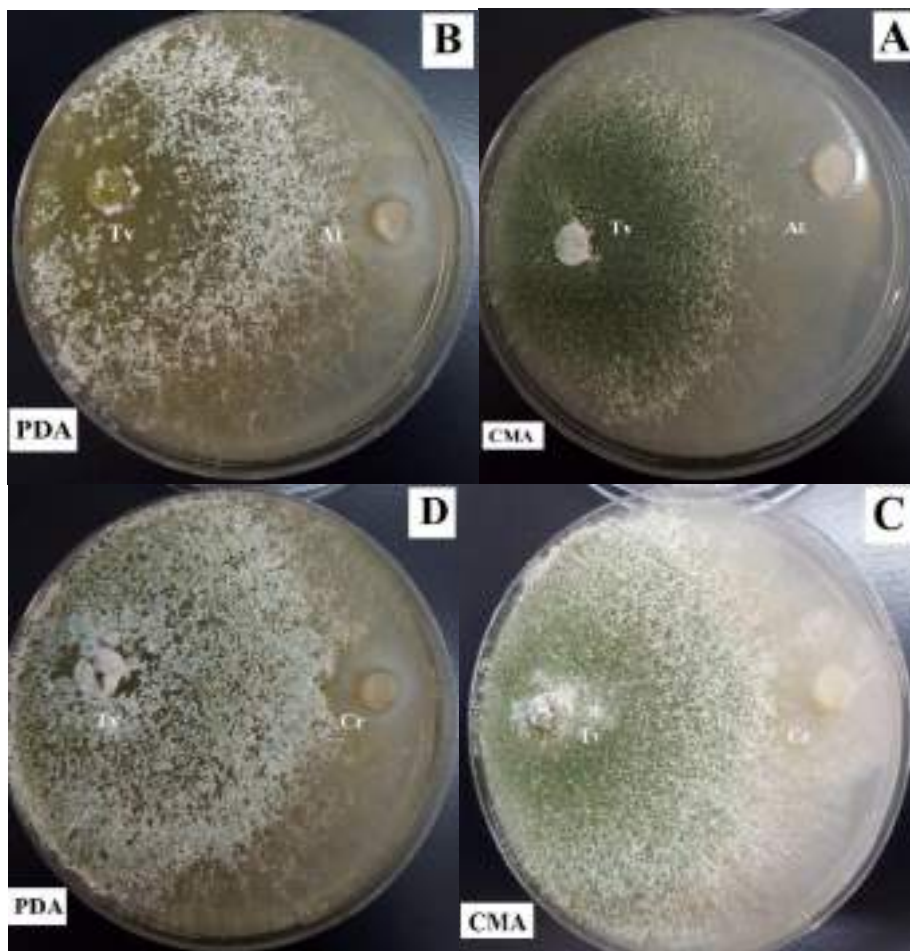




شكل (3-6) التصادم بين A و B الفطر *T.harzianum* ضد الفطر *C.rosea* ، C و D الفطر *T.viride* ضد الفطر *T.harzianum* ، E و F الفطر *T.viride* ضد الفطر *A.conoides* على الوسطين PDA و CMA



شكل (3-7) التصادم بين الفطر *T. viride* والفطريات الصائفة للنيماتود على الوسطين PDA و CMA، A و B ضد الفطر *A. eudermata*، C و D ضد الفطر *A. microscaphoides*، E و F ضد الفطر *A. oligospora*



شكل (8-3) التضاد بين الفطر *T. viride* والفطريات الصائدة للنيما تود على الوسطين CMA و PDA، A و B ضد الفطر *A. thausasia*، C و D ضد الفطر *C. rosea*

#### 4-3: دراسة تأثير روائح الفطرين *T. viride* و *T. harzianum* في نمو الفطريات للصائدة للنيما تود:

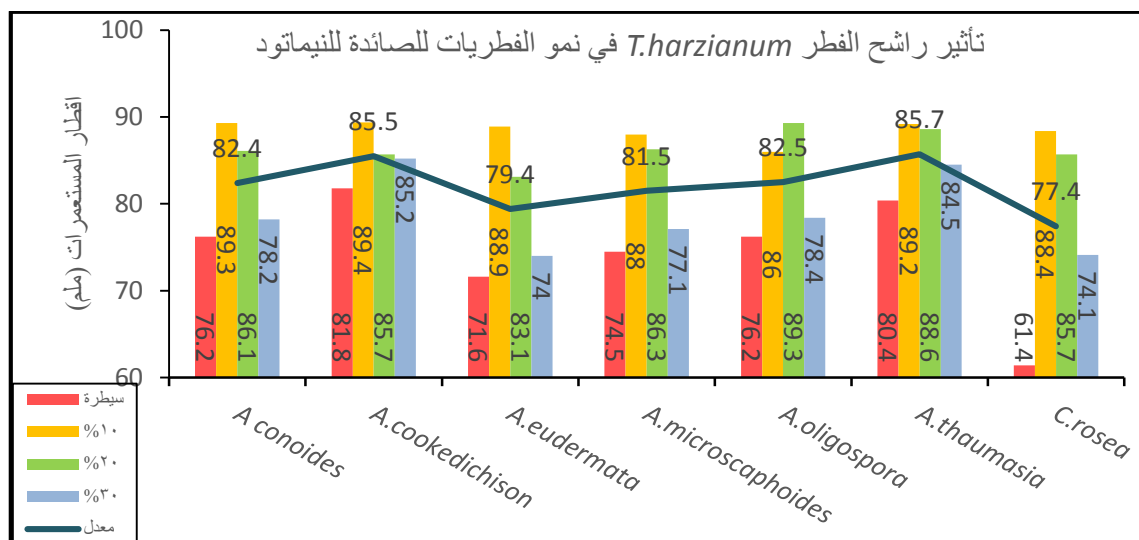
استخدم روائح *T. virid* و *T. harzianum* حيث أوضحت نتائج الدراسة أن تأثير روائح الفطر *T. harzianum* على نمو الفطريات الصائدة للنيما تود المختبرة كان أفضل من تأثير روائح الفطر *T. viride* (الاشكال 9-3 و 16-3)

كما أوضحت النتائج أن تأثير روائح الفطر *T. harzianum* على نمو الفطريات الصائدة للنيما تود المختبرة كان واضح جدا حيث أدى إلى زيادة النمو ، وان النمو اختلف باختلاف أنواع الفطريات، فوجد أن أعلى تأثير للرائح كان على نمو الفطر *A. thausasia* و *A. cookedickison* بمعدل بلغ 85.7 و 85.5 ملم لكل منهما على التوالي وتلاه الفطر *A. conoides* حيث بلغ 82.5 ملم، في حين ظهر اقل نمو في الفطر *C. rosea* وبمعدل نمو 77.4 ملم، أما عند مقارنة نمو هذه الفطريات في التراكيز فوجد أن التراكيزين 10 و 20%



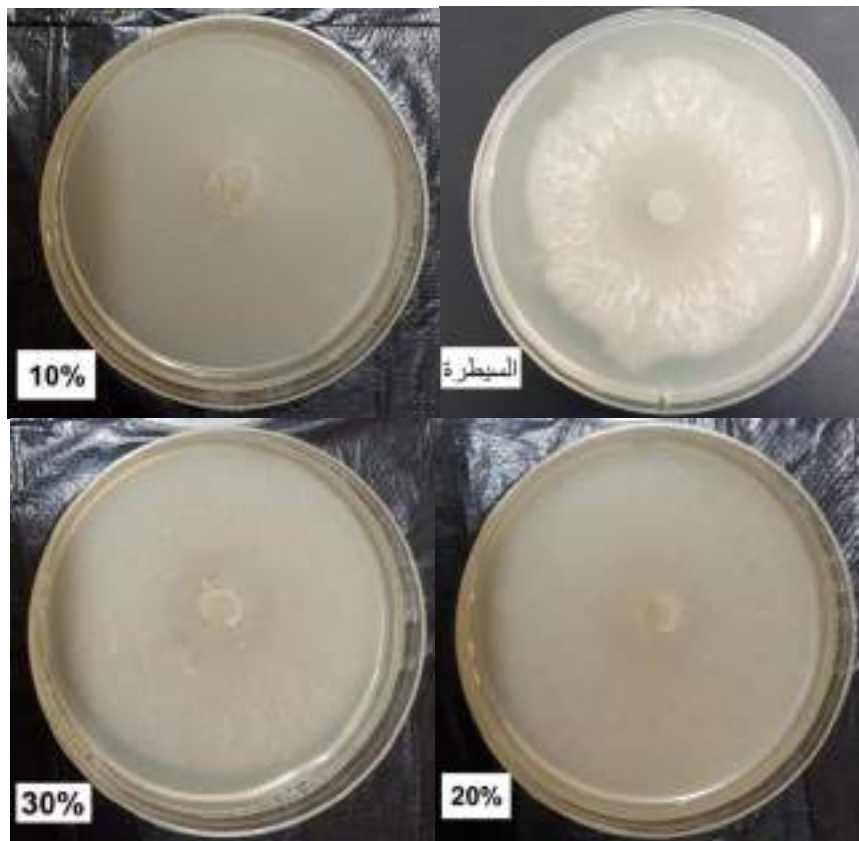
هما الأفضل في التأثير على النمو فبلغا 88.4 و 86.4 ملم لكل منهما على التوالي ، أما عند التركيز 30% فكان النمو اقل اذ بلغ 78.8 ملم بينما اظهرت معاملة السيطرة اقل نمو فكان 74.6 ملم (شكل 9-3).

يوضح شكل 8-3 أن نمو الفطريات المختبرة اختلف عند نموها في التركيز 10% فظهر أعلى نمو في الفطرين *A.conoides* و *A.cookedickison* حيث بلغ 89.3 و 89.4 ملم لكل منهما على التوالي وتلاه الفطر *A.thaumasia* الذي كان 89.2 ملم مقارنةً بمعاملة السيطرة التي كانت 81.8 ملم، أما اقل نمو فظهر في الفطر *A.oligospora* وبمعدل نمو 86 ملم، أما نمو الفطريات في التركيز 20% فكان متفاوت أيضاً، فقد اظهر الفطرين *A.oligospora* و *A.thaumasia* أفضل نمو بلغ 89.3 و 88.6 ملم لكل منهما على التوالي مقارنةً بمعاملة السيطرة التي بلغ النمو فيها 76.2 ملم وتلاهوا الفطر *A.microscaphoides* إذ بلغ معدل النمو 86.3 ملم في حين اقل تأثير كان على الفطر *A.eudermata* وبمعدل نمو بلغ 83.1 ملم، واختلف نمو الفطريات في التركيز 30% اختلافاً واضح مقارنة مع معاملة السيطرة، فكان أعلى نمو في الفطر *A.cookedickison* و *A.thaumasia* والذي كان 85.2 و 84.5 ملم على التوالي تلاهما الفطر *A.oligospora* بمعدل نمو بلغ 78.4 ملم في حين اقل نمو ظهر في الفطر *A.eudermata* وبمعدل وبمعدل نمو 74.0 ملم (شكل 9-3).

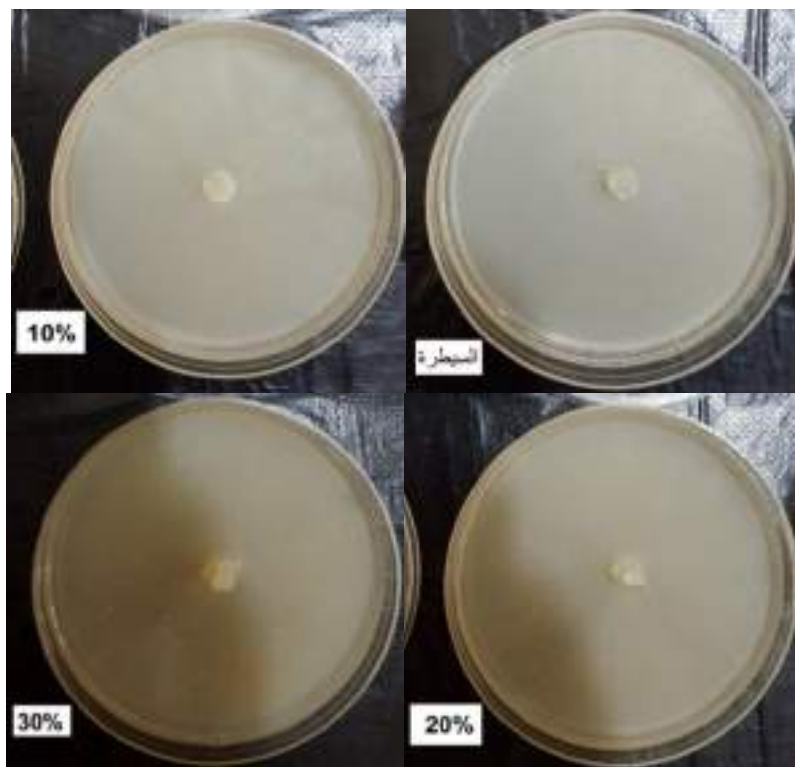


قيمة الـ LSD للفطريات = 0.92، للتركيز = 0.70، معاملات التداخل = 1.85

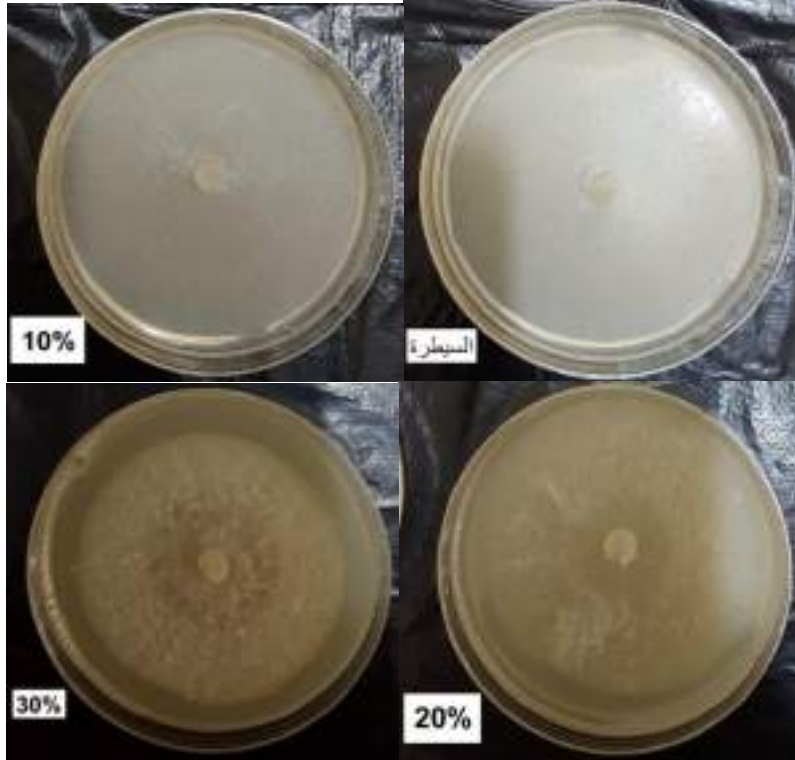
شكل (9-3) تأثير راسح الفطر *T.harzianum* على نمو الفطريات للصائدة للنيما تود المختبرة



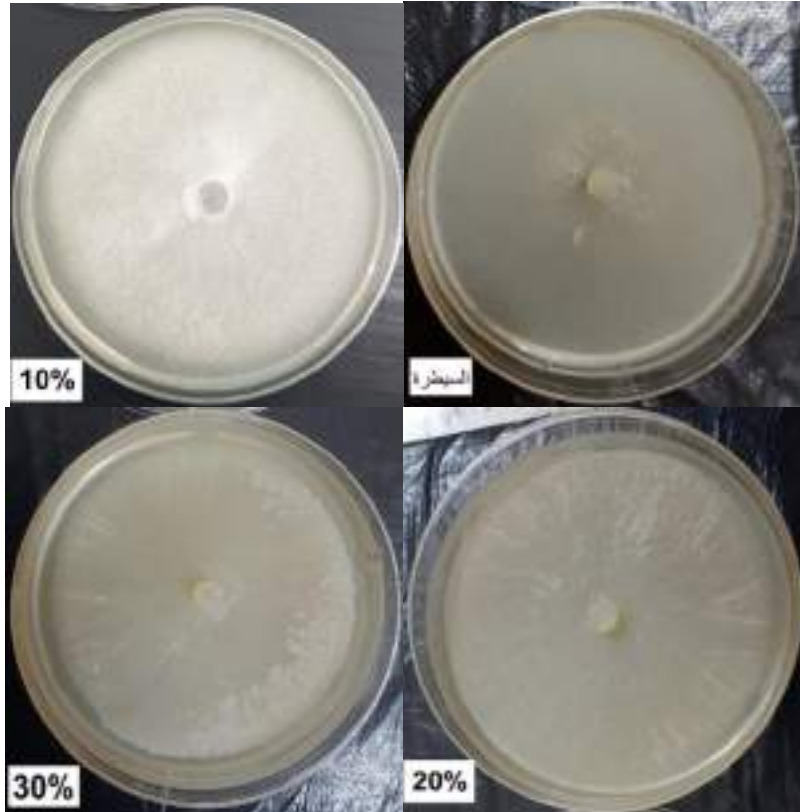
شكل (3-10) تأثير تراكيز من راشح الفطر *T.harzianum* في نمو الفطر *A.conoides*



شكل (3-11) تأثير تراكيز من راشح الفطر *T.harzianum* في نمو الفطر *A.cookedickison*

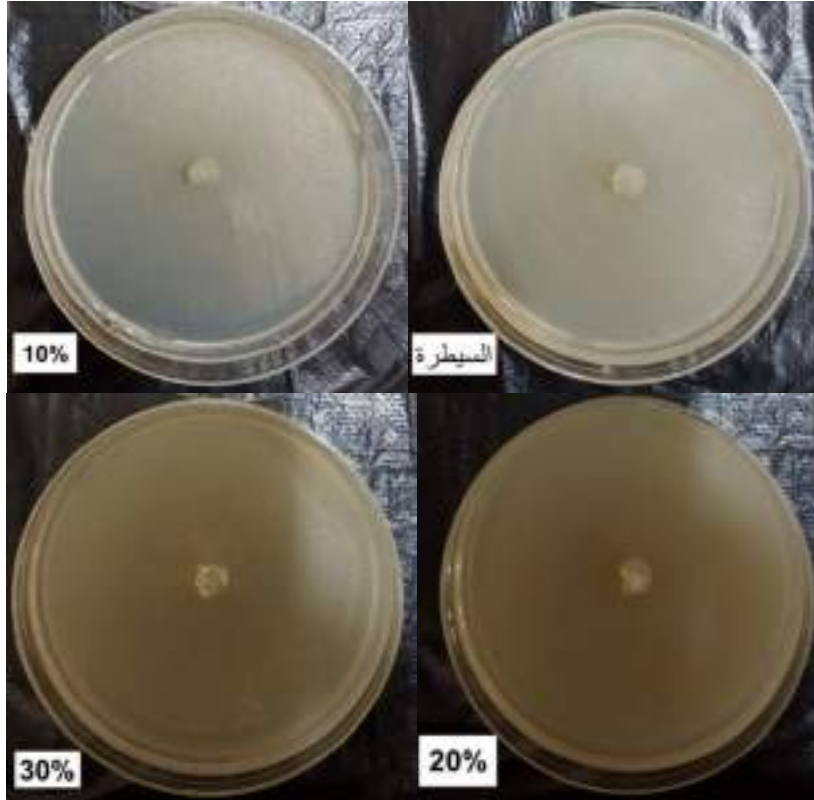


شكل (12-3) تأثير تراكيز من راشح الفطر *T.harzianum* في نمو الفطر *A.eudermata*

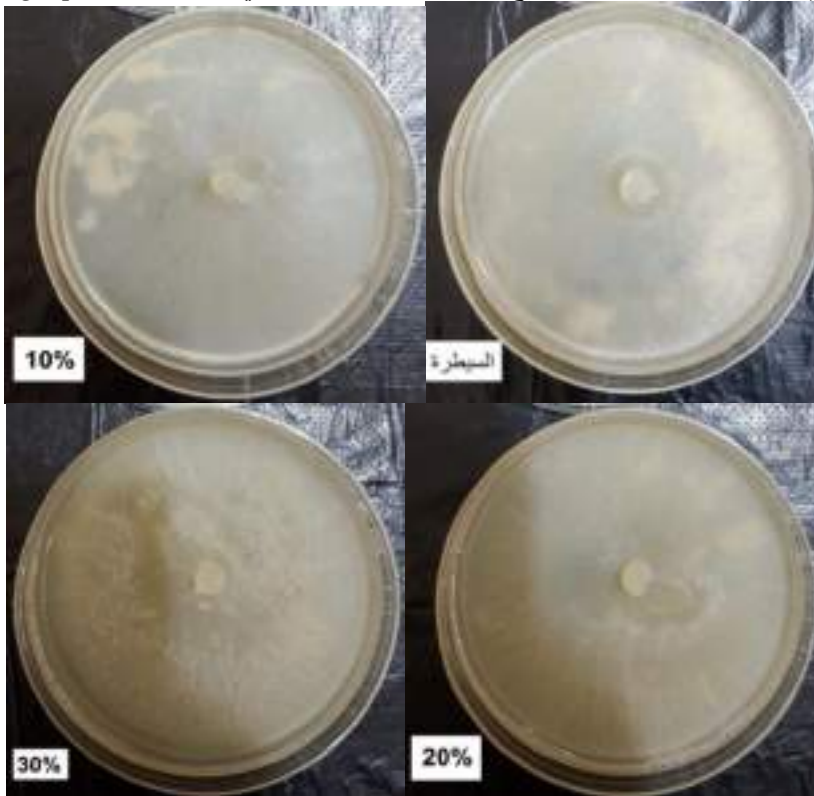


شكل (13-3) تأثير تراكيز من راشح الفطر *T.harzianum* في نمو الفطر *A.microscaphoides*

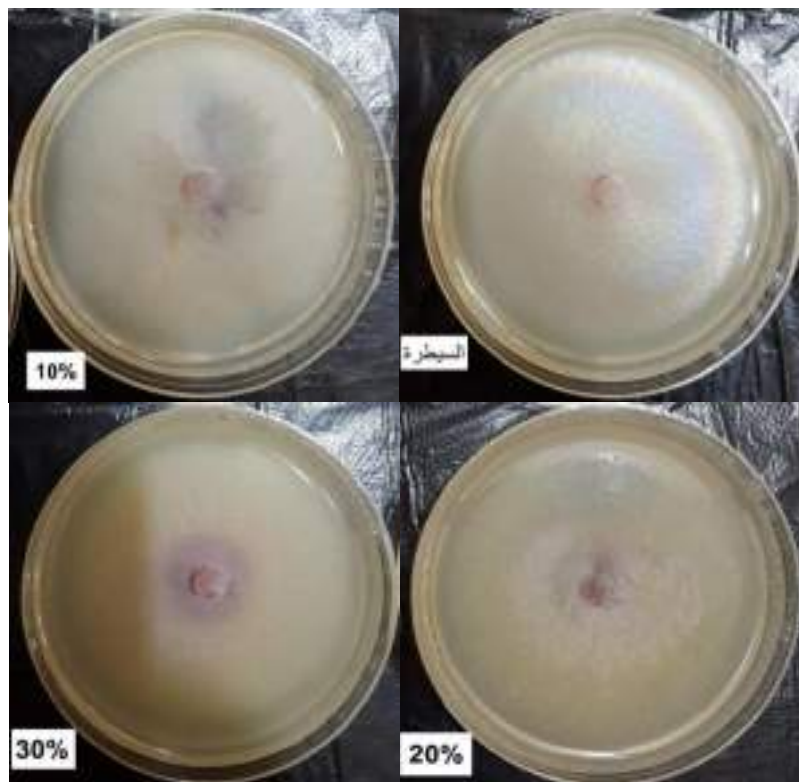




شكل (3-14) تأثير تراكيز من راشح الفطر *T.harzianum* في نمو الفطر *A.oligospora*



شكل (3-15) تأثير تراكيز من راشح الفطر *T.harzianum* في نمو الفطر *A.thaumasia*



شكل (3-16) تأثير تراكيز من راشح الفطر *T.harzianum* في نمو الفطر *C.rosea*

أوضحت النتائج أن تأثير راشح الفطر *T.viride* على نمو الفطريات الصائدة للنيماتود المختبرة كان واضحاً جداً حيث أدى إلى زيادة النمو، وكان النمو يختلف باختلاف أنواع الفطريات، فوجد أن أعلى تأثير للراشح على نمو الفطرين *A.cookedickison* و *C.rosea* والتي بلغت 81.7 و 81.0 ملم لكل منهما على التوالي وتلاههما الفطر *A.conoides* الذي كان 80.3 ملم، في حين ظهر أقل نمو في الفطر *A.eudermata* وبمعدل نمو 78.2 ملم، أما عند مقارنة نمو هذه الفطريات في التراكيز فوجد أن التراكيز 10 و 20% هما الأفضل في التأثير على النمو فبلغا 89.3 و 81.4 ملم لكل منهما على التوالي، أما عند التركيز 30% فكان النمو أقل من التراكيز السابقين حيث بلغ 76.4 ملم بصورة معنوية لمقارنات التداخل في حين ظهر أقل نمو في معاملة السيطرة التي كانت 72.4 ملم (شكل 3-17).

يوضح شكل 3-17 أن نمو الفطريات المختبرة اختلف عند نموها في التركيز 10% فظهر أعلى نمو في فطر *A.oligospora* و *C.rosea* الذي بلغ 89.5 و 89.4 ملم لكل منهما على التوالي وتلاههما الفطر *A.conoides* حيث بلغ 89.4 ملم مقارنةً بمعاملة السيطرة الذي كان 70.8 ملم، أما أقل نمو فظهر في الفطر *A.microscaphoides* وبمعدل نمو 89.1 ملم، أما نمو الفطريات في التركيز 20% فكان متفاوت أيضاً، فقد اظهر الفطر *A.oligospora* و *C.rosea* أفضل نمو بلغ 86.8 و 84.5 ملم لكل منهما على التوالي وتلاه الفطر *A.cookedickison* إذ بلغ

84.3 ملم مقارنةً بمعاملة السيطرة التي كانت 70.8 ملم، في حين أقل تأثير للفطر *A.eudermata* وبمعدل نمو 76.8 ملم، واختلف نمو الفطريات في التركيز 30% اختلاف معنوي واضح مقارنة مع معاملة السيطرة، فكان أعلى نمو في الفطر *A.cookedickison* و *C.rosea* الذي بلغ 78.2 و 77.4 ملم على التوالي تلاهما الفطر *A.microscaphoides* إذ كان 77.3 ملم في حين أقل تأثير للفطر *A.oligospora* وبمعدل نمو 72.7 ملم.

من خلال مراجعة الدراسات والبحوث السابقة تعتبر أنواع الفطر *Trichoderma* انواع مثبطة لنمو الفطريات وخصوصا الفطريات الممرضة وأشارت تلك الدراسات الى امتلاك هذه الأنواع اليات مختلفة تستخدمها للحد من نمو تلك الفطريات الممرضة ( Al-Hazmi et al., 2016)، ولم تشير تلك الدراسات الى ان أنواع هذا الجنس تحفز نمو فطريات أخرى قد تستخدم لتحفيز نمو النبات او البذور. لذلك قد تكون هذه الدراسة هي الأولى التي إشارة الى ذلك.

تمتاز أنواع الجنس *Trichoderma* بقدرتها العالية على التكيف مع مختلف الظروف، ويرجع استخدامها في السيطرة البيولوجية الى افرازها عدد كبير من مواد الايض الثانوي منها (6-Pentyl pyrone) وأيضا تم اكتشاف Gliotoxin عام 1930 (Weindling and Emerson, 1936).

وجد ان الفطر *T.harzianum* يفرز انزيم Xylanase وكذلك الفطر *T.virid* يفرز انزيم Endopolygalacturonase وأيضا تفرز (IAA) Indole acid acetic و Phytohormones ولهما دور مهم في تطوير النبات والاستجابة الدفاعية (Hermosa et al., 2014) والتي قد تؤدي الى زيادة نمو الفطريات لكن يحتاج الى مزيد من الدراسات.

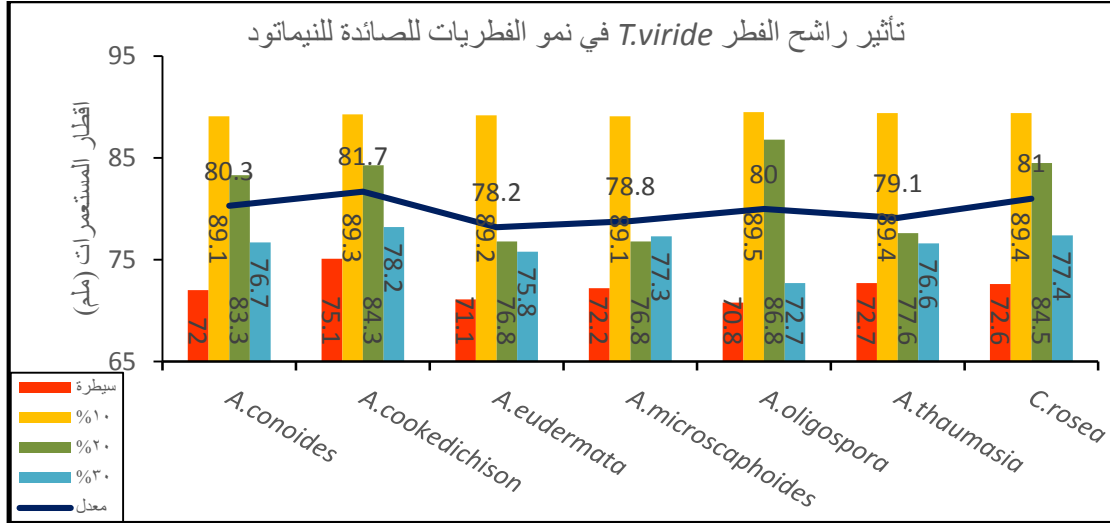
قد يعزى سبب زيادة نمو الفطريات الصائدة للنيما تود الى ان بعض عزلات الفطر *Trichoderma* تفرز الكثير من المواد الايضية التي تساعد على النمو منها الاحماض الامينية مثل Citric acid، Gluconic acid، Fumaric acid (Brotman et al., 2010)، فهو يستخدم على نطاق واسع وله القابلية على انتاج الانزيمات المرتبطة في مكافحة الحيوية Singh (et al., 2015) ومن الانزيمات التي ينتجها الفطر Cellulose، Lipase، Laccase (Zhang et al., 2017).

واحدة من اهم مشاكل تقدير المقاومة الحيوية عند استخدام عامل سيطرة واحد Biocontrol agent (BCA) (فطري أو بكتيري) هو انها غالبا ما تكون غير كفؤة اتجاه النيما تود، وان فعالية السيطرة الحيوية تزداد عند مزج عوامل سيطرة متعددة Biocontrol agents، وان مزج نواتج

هذه العوامل من المحتمل تعطي انواع واسعة من تأثيرات السيطرة الحيوية وتحت مدى واسع من الظروف البيئية (Szabó et al., 2012).

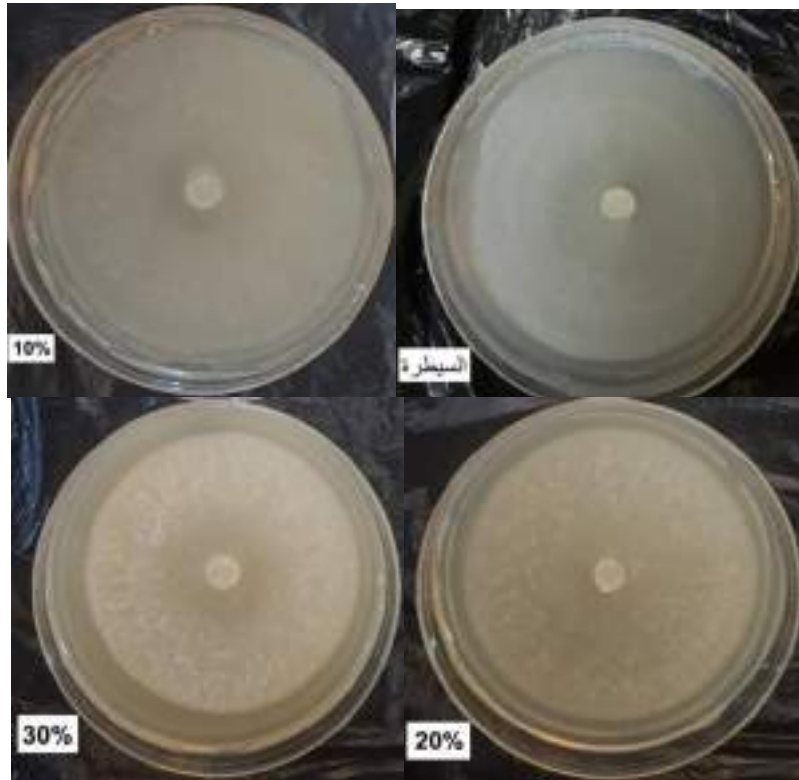
بما ان أنواع الفطر *Trichoderma* spp. تستخدم كعوامل سيطرة حيوية ضد الفطريات الممرضة بطريقة التطفل الفطري (Mycoparasitism) او افراز مواد مثبطة ضد النيماتود ايضاً ومن ضمنها نيماتود العقد الجذرية، وان الفطريات الصائدة للنيماتود تستخدم كعوامل سيطرة حيوية أيضاً ضد نيماتود العقد الجذرية وكما اشارت الدراسات ان مزج اكثر من عامل سيطرة احيائية يؤدي الى زيادة فعالية هذه السيطرة، ولمعرفه هل يؤدي ذلك الى زيادة فعالية السيطرة الحيوية ضد نيماتود تعقد الجذور لابد من معرفة تأثير إضافة راشح الفطر *Trichoderma* على المزارع النقية للفطريات الصائدة للنيماتود فيما اذا كان له تأثير مثبت او محفز لنموها ومن خلال مراجعة المصادر والدراسات المنشورة لم نجد أي دراسة تشير الى ان رواشح أنواع الجنس *Trichoderma* تحفز نمو الفطريات ومن ضمنها الفطريات الصائدة للنيماتود فوجد بعد دراسة النتائج انها لا تتفق مع ما ذكر أعلاه من ان الفطر *Trichoderma* يثبط نمو الفطريات الأخرى وخصوصاً المرضية منها عن طريق افراز مواد تثبط نموها او تحلل جدرانها لذلك يعتقد ان بعض المواد التي تفرزها انواع الفطر *Trichoderma* والتي ذكر بانها تتجاوز 100 مركب (Druzhinina et al., 2011) ربما تؤدي الى زيادة النمو الشعاعي للفطريات المختبرة، وهذه المواد تقسم الى ثلاثة أنواع هي مضادات حيوية ومواد ذائبة بالماء مثل الاحماض العضوية وبعض المواد قليلة الببتيد (Oligopeptide) التي تضم 12-22 حامض اميني فنعتقد ان هذه القطع قليلة الببتيد (Vinale et al., 2009) بما تحتويه من احماض امينية قد تكون هي السبب في زيادة نمو الفطريات الصائدة للنيماتود.

هناك أكثر من 100 مركب ايض ثانوي تنتجها أنواع الجنس *Trichoderma* تم تشخيصها تتضمن إنزيمات تحلل الجدران الخلوية للفطريات ومضادات حيوية واسعة الطيف مثل gliotoxin (Druzhinina et al., 2011; Pozo et al., 2004).

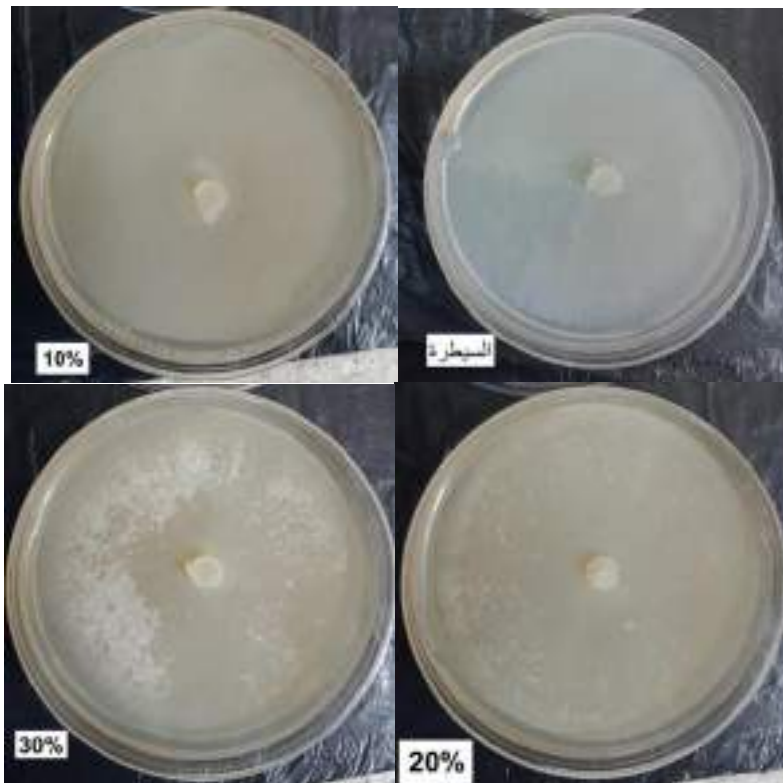


قيمة ال-LSD للفطريات = 1.30، للتراكيز = 0.98، معاملات التداخل = 2.60

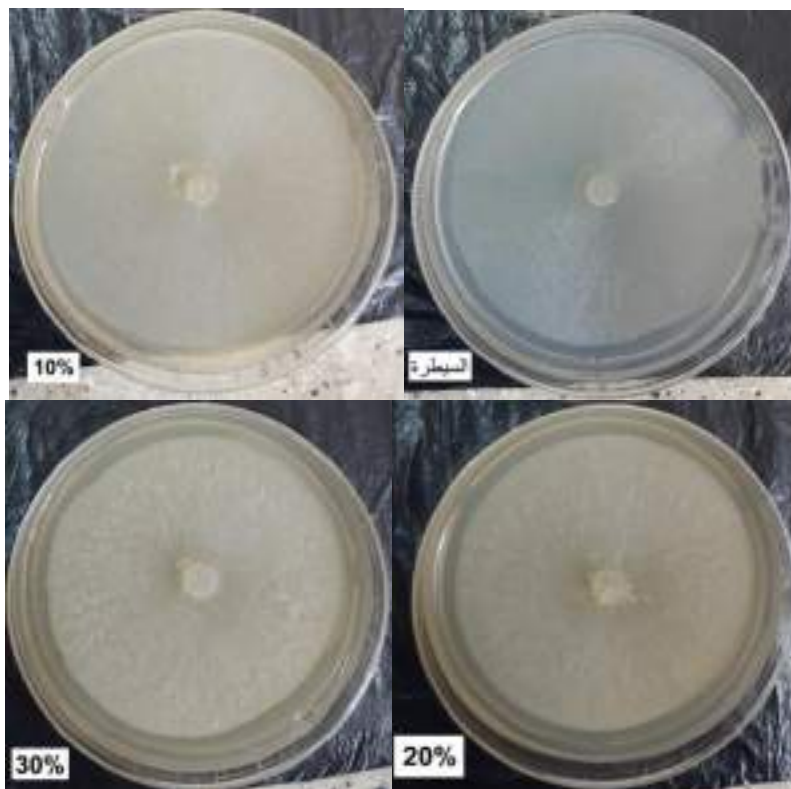
شكل (17-3) تأثير راشح *T. viride* على نمو الفطريات للصائدة للنيما تود.



شكل (18-3) تأثير تراكيز من راشح الفطر *T. viride* في نمو الفطر *A. conoides*

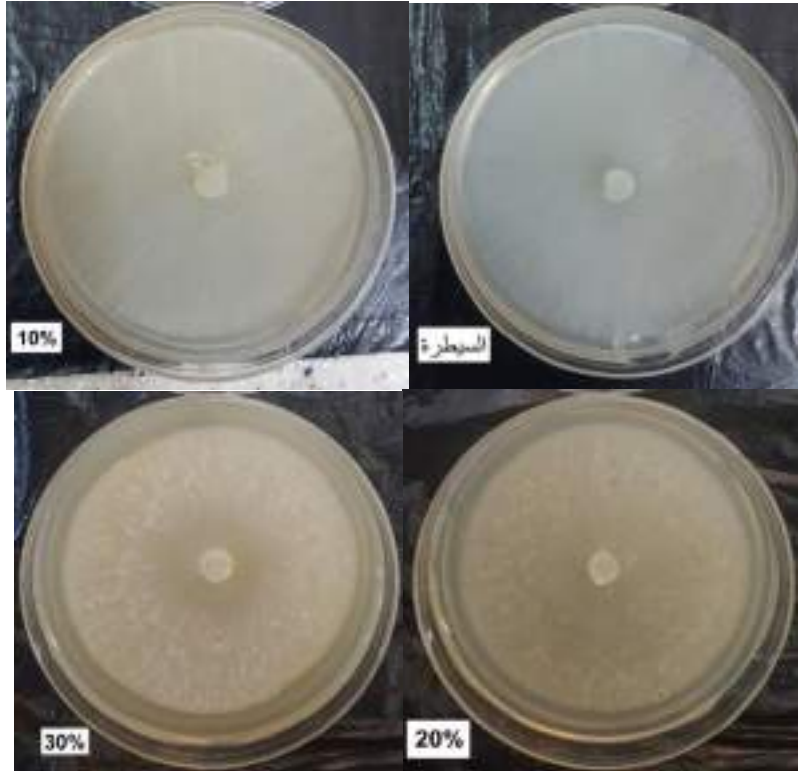


شكل (3-19) تأثير تراكيز من راشح الفطر *T. viride* في نمو الفطر *A. cookedickison*

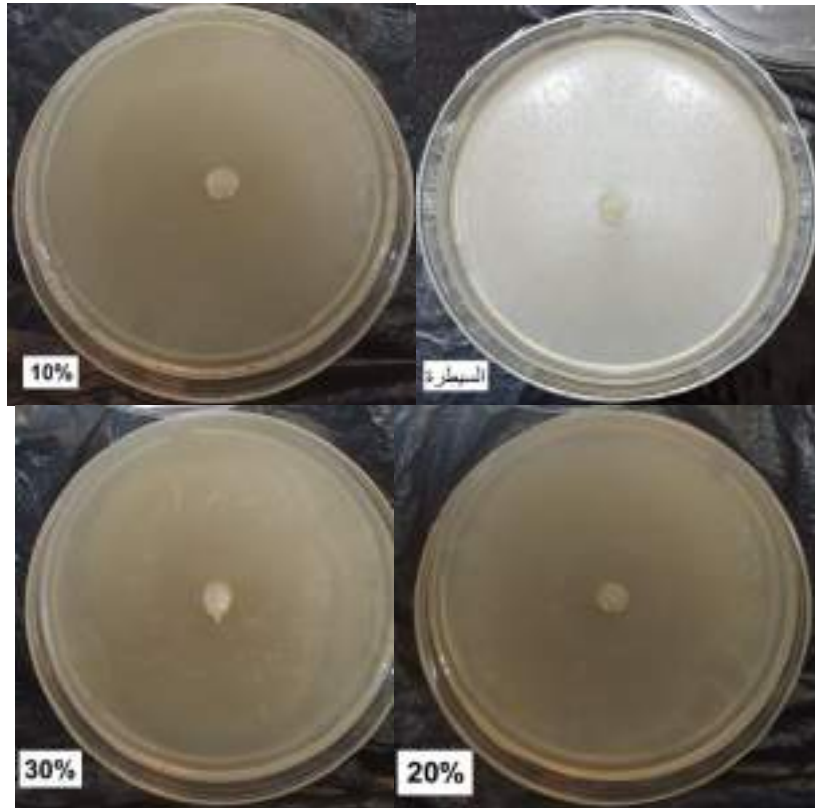


شكل (3-20) تأثير تراكيز من راشح الفطر *T. viride* في نمو الفطر *A. eudermata*

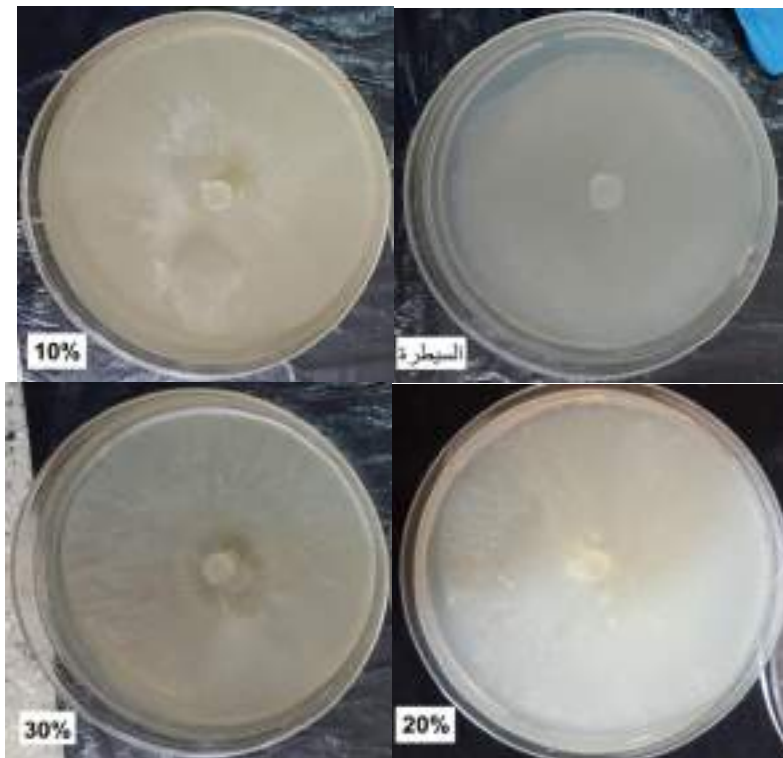




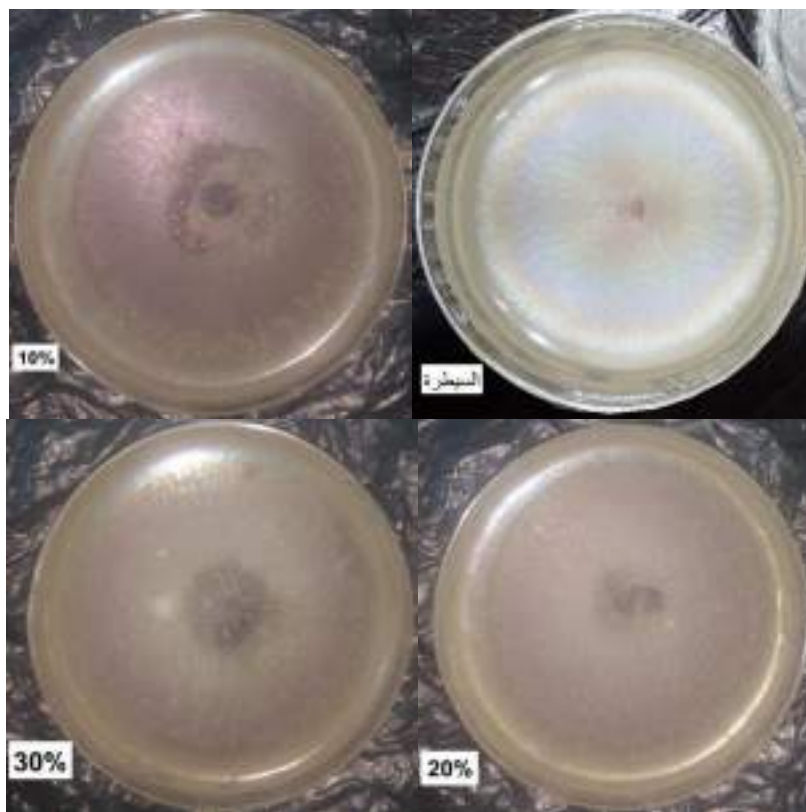
شكل (3-21) تأثير تراكيز من راشح الفطر *T. viride* في نمو الفطر *A. microscaphoides*



شكل (3-22) تأثير تراكيز من راشح الفطر *T. viride* في نمو الفطر *A. oligospora*



شكل (3-23) تأثير تراكيز من راشح الفطر *T. viride* في نمو الفطر *A. thaumasia*



شكل (3-24) تأثير تراكيز من راشح الفطر *T. viride* في نمو الفطر *C. rosea*



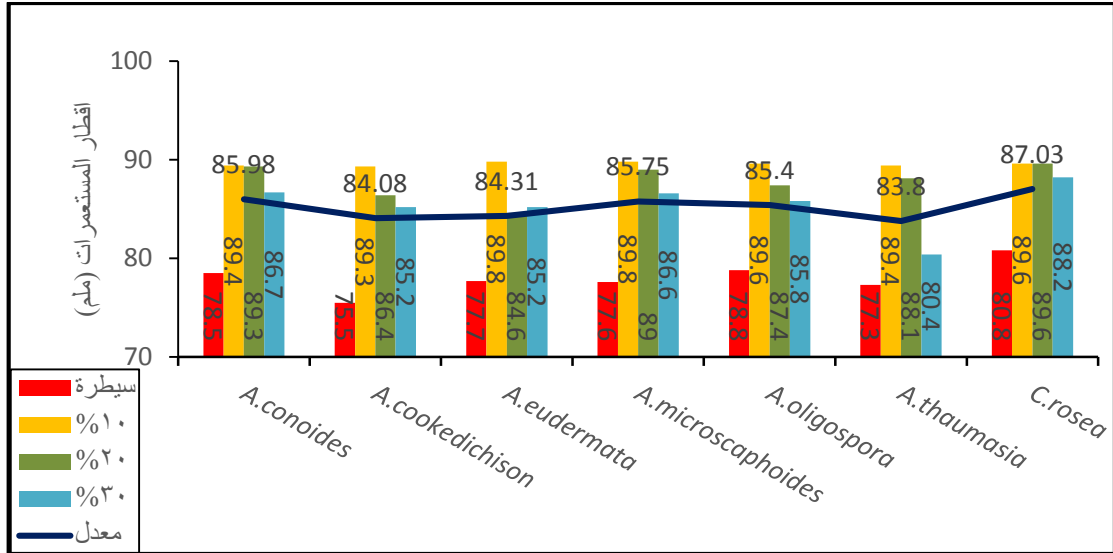
### 5-3: دراسة تأثير راشح مستعمرة البكتريا *P.fluorescens* في نمو الفطريات الصائدة للنيما تود

أوضحت النتائج أن تأثير راشح البكتريا *P.fluorescens* على نمو الفطريات الصائدة للنيما تود المختبرة كان واضحاً جداً حيث أدى إلى زيادة النمو الشعاعي لها وان تأثيرها على النمو أفضل من تأثير الفطرين *T.harzianum* و *T.viride*، وكان النمو يختلف باختلاف أنواع الفطريات ، فوجد أن أعلى تأثير للراشح على نمو الفطر *C.rosea* و *A.conoides* بمعدل بلغ 87.03 و 85.98 ملم على التوالي وتلاهما الفطر *A.microscaphoides* إذ بلغ 85.75 ملم، في حين ظهر أقل نمو في الفطر *A.thaumasia* وبمعدل نمو 83.80 ملم، أما عند مقارنة نمو هذه الفطريات في التراكيز فوجد أن التراكيز 10% و 20% هما الأفضل في التأثير على النمو فبلغا 89.5 و 87.77 ملم لكل منهما على التوالي ، أما عند التركيز 30% فكان النمو أقل من التراكيزين السابقين إذ بلغ 85.45 ملم مقارنةً بمعاملة السيطرة التي كان النمو فيها 78.01 ملم (شكل 3-25). يوضح الشكل 3-25 أن نمو الفطريات المختبرة اختلف عند نموها في التركيز 10% فظهر أعلى نمو في فطرين *A.eudermata* و *A.microscaphoides* والذي بلغ 89.8 ملم لكل منهما مقارنةً بمعاملة السيطرة الذي كان النمو فيهما 77.7، 77.6 ملم على التوالي وتلاهما الفطر *C.rosea* الذي بلغ 89.6 ملم، أما أقل نمو فظهر في الفطر *A.cookedickison* وبمعدل نمو 89.3 ملم، أما نمو الفطريات في التركيز 20% فكان متفاوت أيضاً ، فقد اظهر الفطر *C.rosea* و *A.conoides* أفضل نمو بلغ 89.6 و 89.3 ملم على التوالي مقارنةً بمعاملة السيطرة التي كان النمو فيها 80.8 ملم وتلاه الفطر *A.microscaphoide* إذ بلغ 89.0 ملم، بينما اظهر الفطر *A.eudermata* أقل نمو إذ بلغ 84.6 ملم، واختلف نمو الفطريات في التركيز 30% اختلاف واضح مقارنةً مع معاملة السيطرة، فكان أعلى نمو في الفطر *C.rosea* و *A.conoides* والذي بلغ 88.2 و 86.7 ملم على التوالي تلاهما الفطر *A.microscaphoides* الذي كان 76.6 ملم في حين كان أقل نمو ظهر في الفطر *A.eudermata* وبمعدل نمو 80.4 ملم.

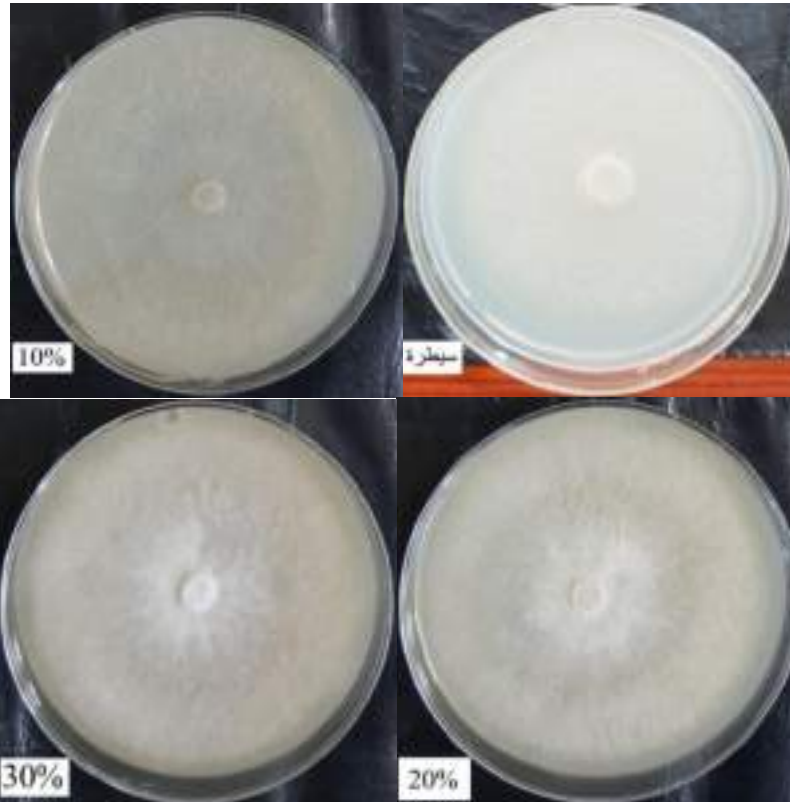
اثبتت العديد من الدراسات ان البكتريا *P.fluorescens* ذات قدرة عالية على كبح الكثير من الممرضات النباتية الأساسية الموجودة في التربة، بالإضافة الى استعمارها للجذور والذي يوفر حماية للنبات ضد المسببات المرضية، وكانت البكتريا *P.fluorescens* العنصر الفعال في الكثير من البحوث والدراسات المتضمنة برامج مكافحة الاحيائية (عبدالرضا واخرون، 2010).

ان هذه الدراسة بينت ان هذه البكتريا تحفز او تؤدي الى زيادة نمو الفطريات ولكن يمكن القول ان البكتريا تنتج العديد من مواد الايض الثانوي منها , Plant hormone regulators،

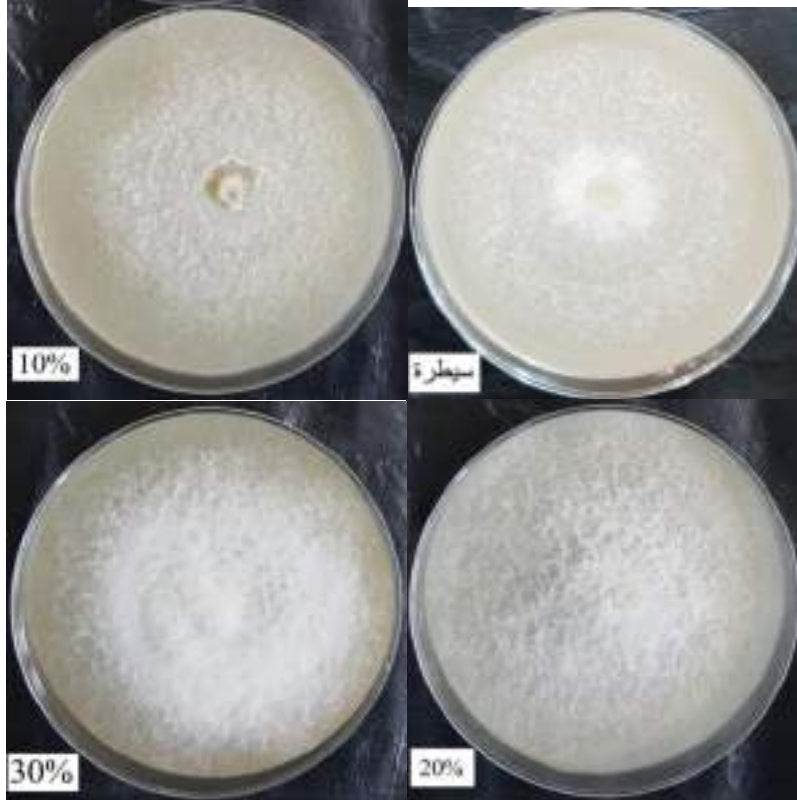
Phenazin derivatives ، 2,4-Diacetylphlogucinol ، Siderophores ، Pyoluteorin (Dunbabin *et al.* 2013) والتي قد تكون هي السبب في زيادة نمو الفطريات.



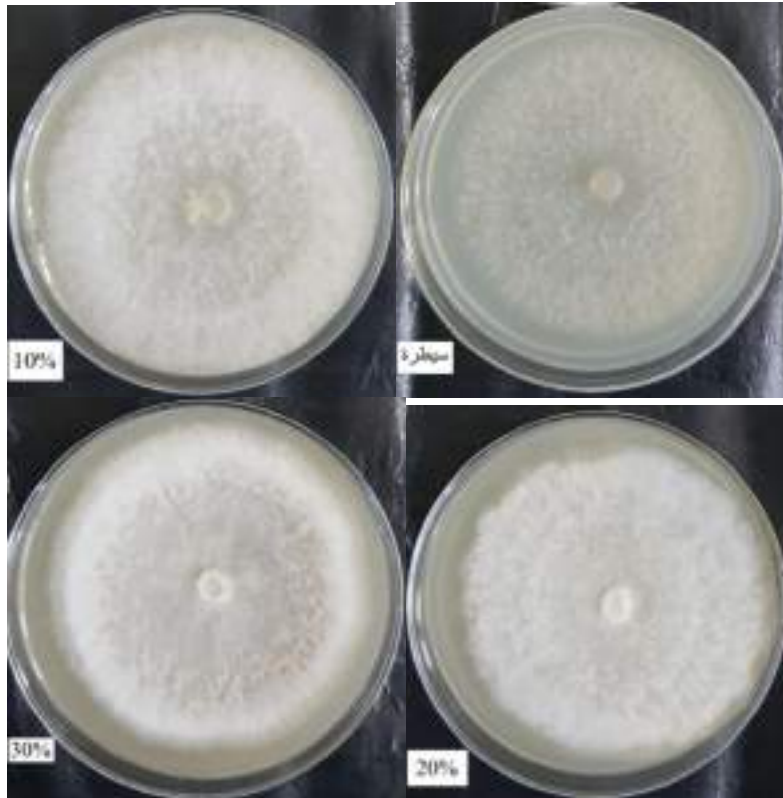
قيمة الـ LSD للفطريات = 1.147، للتراكيز = 0.867، معاملات التداخل = 2.294. شكل (25-3) تأثير راشح *P.fluorescens* في نمو الفطريات الصائفة للزيماتود



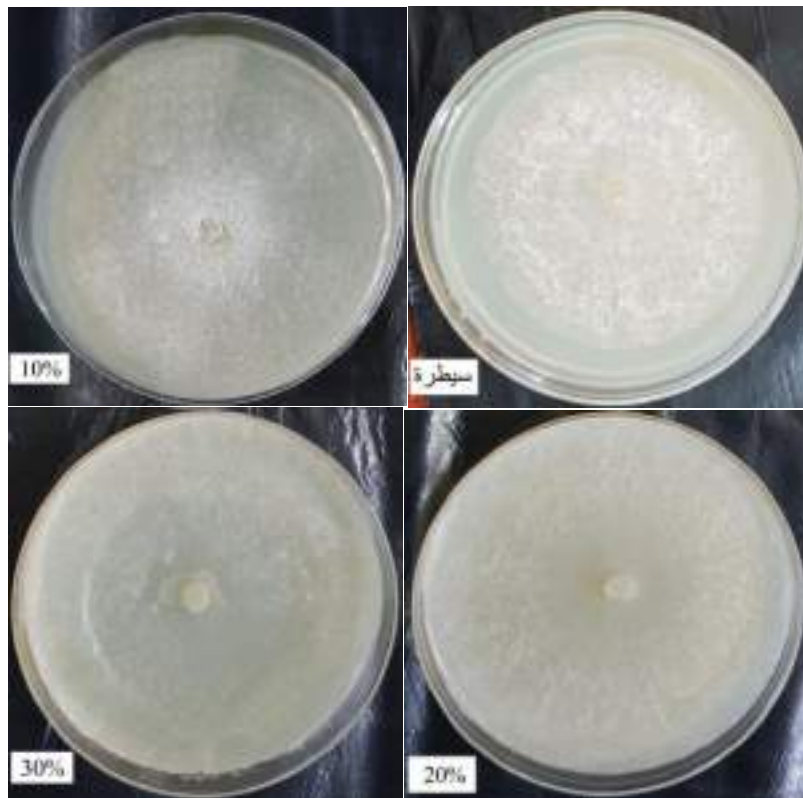
شكل (26-3) تأثير تراكيز من راشح البكتريا *P.fluorescens* في نمو الفطر *A.conoides*



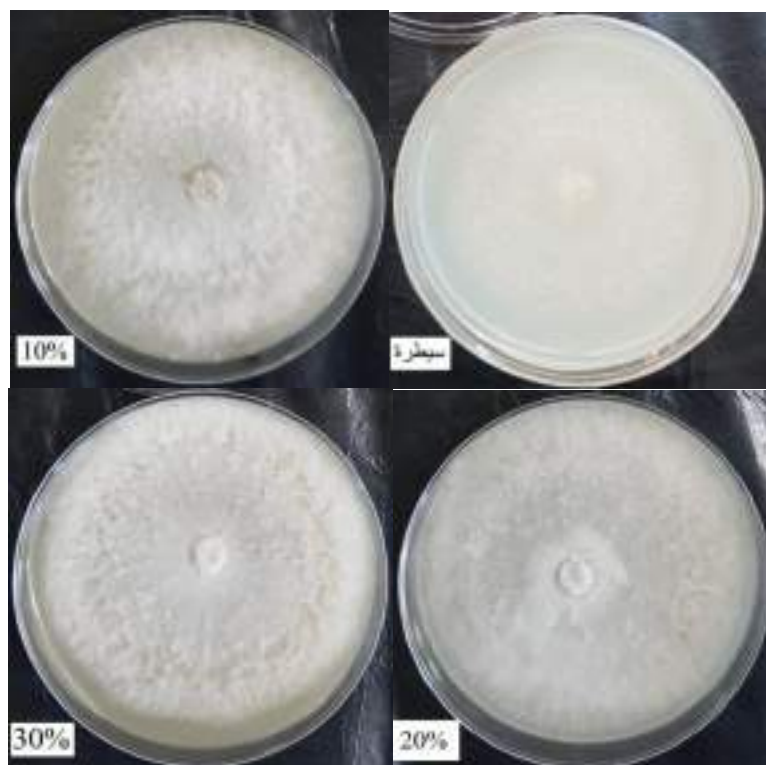
شكل (3-27) تأثير تراكيز من راشح البكتريا *P.fluorescens* في نمو الفطر *A.cookedickison*



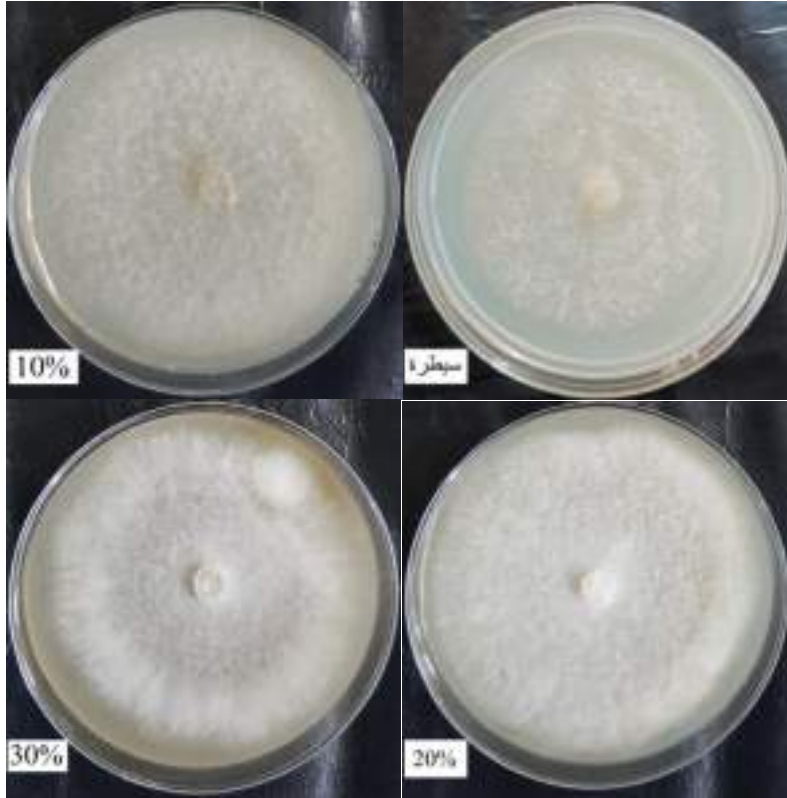
شكل (3-28) تأثير تراكيز من راشح البكتريا *P.fluorescens* في نمو الفطر *A.eudermata*



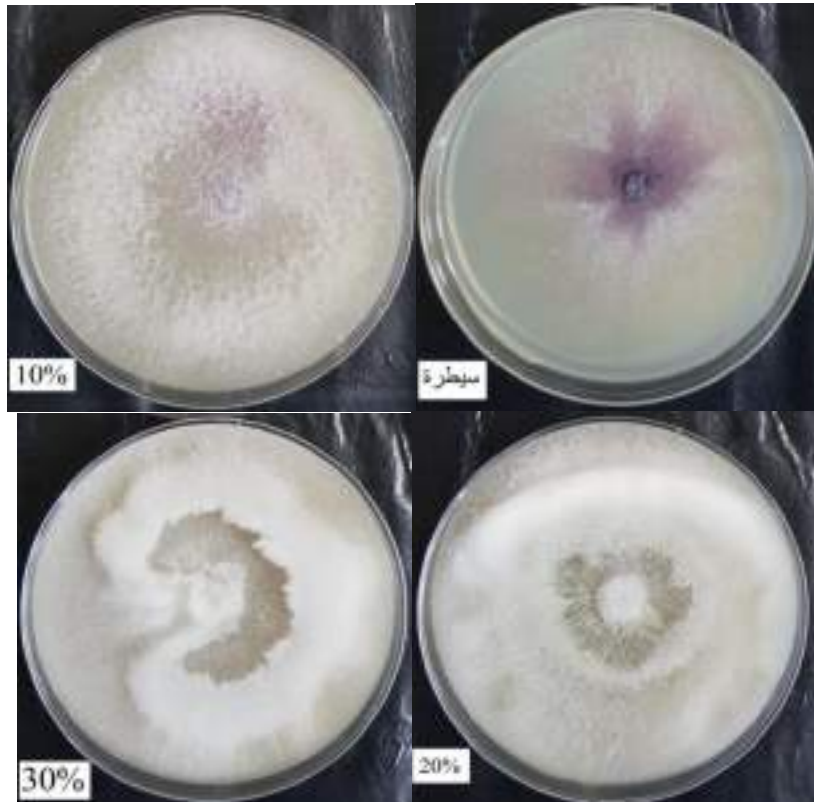
شكل (3-29) تأثير تراكيز من راشح البكتريا *P.fluorescens* في نمو الفطر *A.microscaphoides*



شكل (3-30) تأثير تراكيز من راشح البكتريا *P.fluorescens* في نمو الفطر *A.oligospora*



شكل (31-3) تأثير تراكيز من راشح البكتريا *P. fluorescens* في نمو الفطر *A. thauwasia*



شكل (32-3) تأثير تراكيز من راشح البكتريا *P. fluorescens* في نمو الفطر *C. rosea*

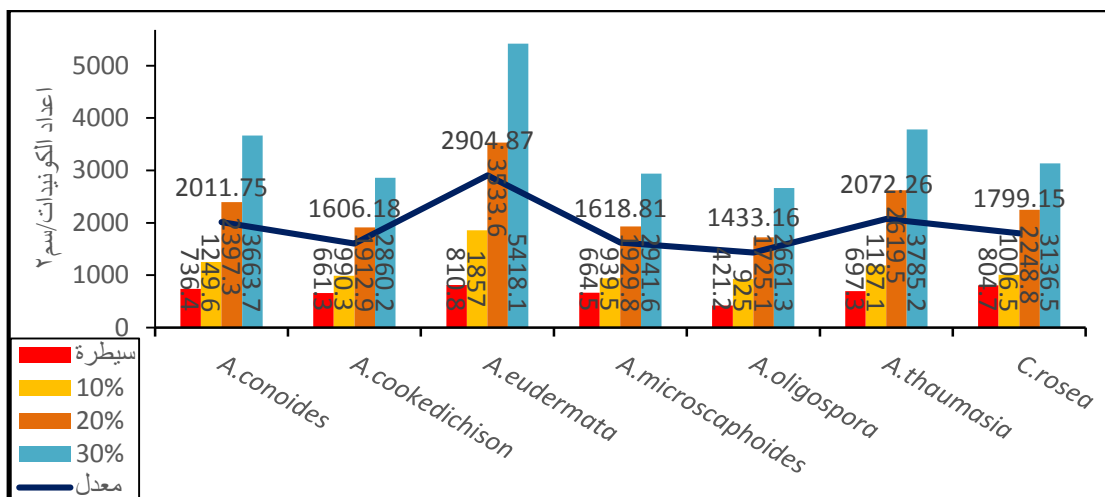


6-3: دراسة تأثير روائح الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* والبكتريا*P.fluorescens* في تكوين الكونيدات

بينت الدراسة ان إضافة روائح الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* والبكتريا *P.fluorescens* كان له تأثير ايجابي على أعداد الكونيدات التي تكونها الفطريات الصائفة للنيما تود والذي ادى إلى زيادتها في جميع المعاملات، وكان تأثير البكتريا *P.fluorescens* هو الأكثر تلاه *T.harzianum* ثم *T.viride* (الاشكال 3-33، 3-34، 3-35).

أوضحت النتائج ان تأثير روائح الفطر *T.harzianum* على زيادة أعداد كونيدات الفطريات الصائفة للنيما تود المختبرة قد اختلف باختلاف أنواع الفطريات فكان أعلى تأثير لهذا الراشح على أعداد كونيدات الفطرين *A.eudermata* و *A.thaumasia* حيث بلغت 2904.87 و 2072.26 كونيدة/سم<sup>2</sup> على التوالي وتلاهما الفطر *A.conoides* بالعدد 2011.75 كونيدة/سم<sup>2</sup>، في حين كان اقل معدل للكونيدات ظهر في الفطر *A.oligospora* وبمعدل 1433.16 كونيدة/سم<sup>2</sup>، وأظهرت النتائج أيضا أن التركيز 30% هو الأفضل في زيادة أعداد الكونيدات إذ بلغ 3495.23 كونيدة/سم<sup>2</sup> تلاه التركيز 20% حيث كان 2338.14 كونيدة/سم<sup>2</sup> ثم التركيز 10% فكان العدد فيه 1164.99 كونيدة/سم<sup>2</sup> مقارنة بمعاملة السيطرة والذي كان 685.17 كونيدة/سم<sup>2</sup> (شكل 3-33).

ويظهر شكل 3-33 أن أعلى زيادة بأعداد الكونيدات ظهرت في الفطرين *A.eudermata* و *C.rosea* حيث بلغت 1857.0 و 1249.6 كونيدة/سم<sup>2</sup> على التوالي عند التركيز 10%، وتلاه الفطر *A.conoides* بالعدد 1187.1 كونيدة/سم<sup>2</sup> في حين كان اقل تأثير للفطر *A.oligospora* وبمعدل 925.0 كونيدة/سم<sup>2</sup>، اما في التركيز 20% ظهرت اعلى زيادة في أعداد الكونيدات في الفطر *A.eudermata* و *A.thaumasia* إذ بلغت 3533.6 و 2619.5 كونيدة/سم<sup>2</sup> على التوالي وتلاه الفطر *A.conoides* بالعدد 2397.3 كونيدة/سم<sup>2</sup>، في حين اقل عدد للكونيدات في للفطر *A.oligospora* وبمعدل 1725.1 كونيدة/سم<sup>2</sup>، وفي التركيز 30% اظهر اعلى زيادة بأعداد الكونيدات في الفطرين *A.eudermata* و *A.thaumasia* إذ بلغت 5418.1 و 3785.2 كونيدة/سم<sup>2</sup> على التوالي وتلاهما الفطر *A.conoides* بالعدد 3663.7 كونيدة/سم<sup>2</sup> في حين اقل عدد للكونيدات ظهر في الفطر *A.oligospora* وبمعدل 2661.3 كونيدة/سم<sup>2</sup>.

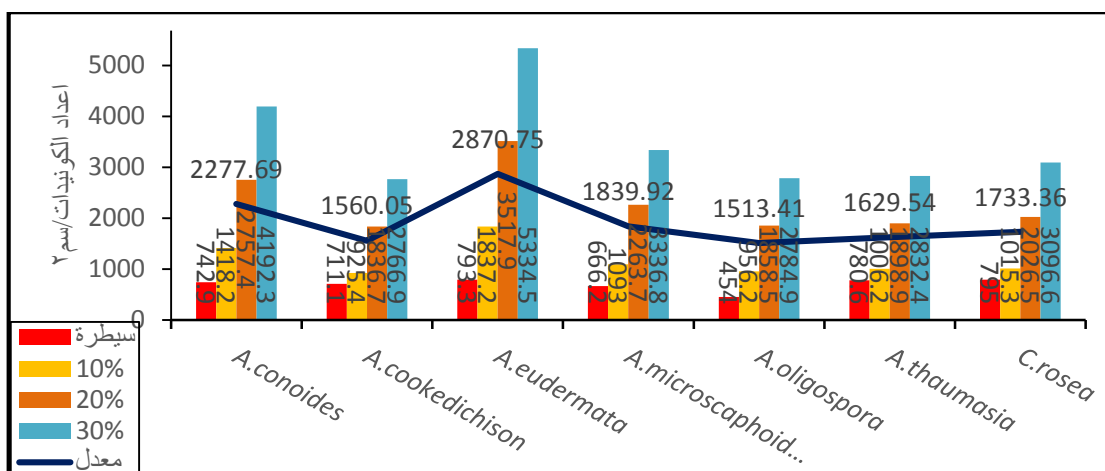


قيمة الـ LSD للفطريات = 19.873، للتراكيز = 15.023، معاملات التداخل = 39.746

شكل (3-33) تأثير راشح *T. harzianum* على عدد الكونيدات (كونيدة/سم<sup>2</sup>) في الفطريات الصائفة للنيما تود أوضحت النتائج في الشكل 3-34 ان تأثير راشح الفطر *T. viride* على زيادة أعداد كونيدات الفطريات الصائفة للنيما تود المختبرة كان واضحاً واختلف باختلاف أنواع الفطريات فكان أعلى تأثير لهذا الراشح على أعداد كونيدات الفطرين *A. conoides* و *A. eudermata* حيث بلغت 2870.75 و 2277.69 كونيدة/سم<sup>2</sup> على التوالي وتلاه الفطر *A. microscaphoides* بالعدد 1839.92 كونيدة/سم<sup>2</sup>، في حين اقل عدد كونيدات كان في الفطر *A. oligospora* وبمعدل 1513.4 كونيدة/سم<sup>2</sup>، وأظهرت النتائج أيضاً أن التركيز 30% هو الأفضل في زيادة أعداد الكونيدات إذ بلغ 3477.76 كونيدة/سم<sup>2</sup> تلاه التركيز 20% الذي كان 2308.54 كونيدة/سم<sup>2</sup> ثم التركيز 10% بالعدد 1178.80 كونيدة/سم<sup>2</sup> مقارنة بمعاملة السيطرة الذي كان 706.17 كونيدة/سم<sup>2</sup>.

ويظهر شكل 3-34 أن أعلى زيادة بأعداد الكونيدات ظهرت في الفطرين *A. eudermata* و *A. conoides* حيث بلغا 1837.2 و 1418.2 كونيدة/سم<sup>2</sup> على التوالي عند التركيز 10%، وتلاه الفطر *A. microscaphoides* بالعدد 1093.0 كونيدة/سم<sup>2</sup> في حين اقل تأثير للفطر *A. cookedickison* وبمعدل 925.4 كونيدة/سم<sup>2</sup>، اما في التركيز 20% ظهرت اعلى زيادة في أعداد الكونيدات في الفطرين *A. conoides* و *A. eudermata* إذ بلغا 3517.9 و 2757.4 كونيدة/سم<sup>2</sup> على التوالي وتلاه الفطر *A. microscaphoides* بالعدد 2263.7 كونيدة/سم<sup>2</sup>، في حين اقل عدد للكونيدات ظهر في الفطر *A. cookedickison* وبمعدل 1836.7 كونيدة/سم<sup>2</sup>، وفي التركيز 30% اظهر اعلى زيادة بأعداد الكونيدات في الفطرين *A. conoides* و *A. eudermata* حيث بلغا 5334.5 و 4192.3 كونيدة/سم<sup>2</sup> على التوالي وتلاه الفطر *A. microscaphoides*

بالعدد 3336.8 كونيذة/سم<sup>2</sup> في حين اقل عدد للكونيدات في الفطر *A. cookedickison* وبمعدل 2766.9 كونيذة/سم<sup>2</sup>.



قيمة الـ LSD للفطريات = 53.894، للتراكيز = 40.740، معاملات التداخل = 107.789

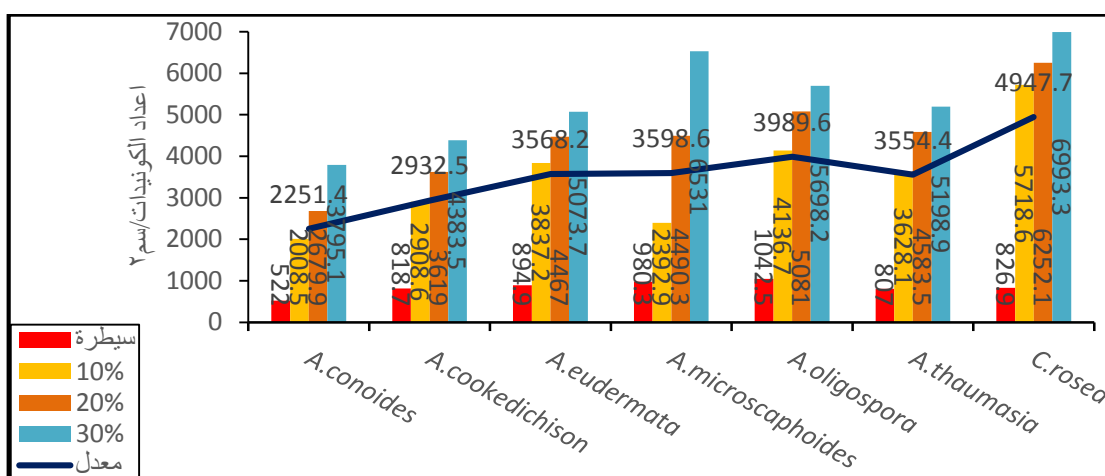
شكل (34-3) تأثير راشح *T. viride* على عدد الكونيدات في الفطريات الصائفة للنيما تود

أوضحت النتائج في الشكل 3-35 ان تأثير راشح البكتريا *P. fluorescens* على أعداد كونيدات الفطريات الصائفة للنيما تود المختبرة كان واضحا من خلال زيادة أعداد هذه الكونيدات حيث اختلف باختلاف أنواع الفطريات فكان أعلى تأثير لهذا الراشح على أعداد كونيدات الفطرين *A. oligospora* و *C. rosea* إذ بلغا 4947.7 و 3989.6 كونيذة/سم<sup>2</sup> على التوالي وتلاه الفطر *A. microscaphoides* بالعدد 3598.6 كونيذة/سم<sup>2</sup>، في حين كان اقل تأثير للفطر *A. conoides* وبمعدل 2251.4 كونيذة/سم<sup>2</sup>، وأظهرت النتائج أيضا أن التركيز 30% هو الأفضل في زيادة أعداد الكونيدات إذ بلغت 5382.0 كونيذة/سم<sup>2</sup> تلاه التركيز 20% بالعدد 4453.3 كونيذة/سم<sup>2</sup> ثم التركيز 10% الذي كان 3518.7 كونيذة/سم<sup>2</sup> مقارنة بمعاملة السيطرة الذي بلغ 841.8 كونيذة/سم<sup>2</sup>.

ويظهر شكل 3-35 عند التركيز 10% أن أعلى زيادة بأعداد الكونيدات ظهرت في الفطرين *A. oligospora* و *C. rosea* حيث بلغا 5718.6 و 4136.7 كونيذة/سم<sup>2</sup> لكل منهما على التوالي وتلاه الفطر *A. eudermata* بالعدد 3837.2 كونيذة/سم<sup>2</sup> في حين اقل عدد ظهر في الفطر *A. conoides* وبمعدل 2008.5 كونيذة/سم<sup>2</sup>، اما في التركيز 20% فقد ظهرت اعلى زيادة في أعداد الكونيدات في الفطرين *A. oligospora* و *C. rosea* إذ بلغت 6252.1 و 5081.0 كونيذة/سم<sup>2</sup> على التوالي وتلاه الفطر *A. thaumasia* بالعدد 4583.5 كونيذة/سم<sup>2</sup>، في حين اقل عدد للكونيدات في الفطر *A. conoides* وبمعدل نمو 2679.9 كونيذة/سم<sup>2</sup>، وفي التركيز 30% اظهر اعلى زيادة بأعداد الكونيدات في الفطرين *A. microscaphoides* و *C. rosea* حيث بلغا



6993.3 و 6531.0 كونيدة/سم<sup>2</sup> على التوالي وتلاه الفطر *A. oligospora* بالعدد 5698.2 كونيدة/سم<sup>2</sup> في حين اقل عدد للكونيدات في الفطر *A. conoides* وبمعدل 3795.1 كونيدة/سم<sup>2</sup>. تشير النتائج الى زيادة اعداد الكونيدات للفطريات الصائفة للنيماتود المختبرة والمعاملة بمستخلصات الفطرين *T. harzianum* و *T. viride* والبكتريا *P. fluorescens* والتي تفرز مواد كثيرة مثل المركبات قليلة البيبتيدات والتي قد تحفز على زيادة انتاج الكونيدات (Hasan, 1998) وعلى العموم ان زيادة اعداد الكونيدات في تركيز 30% ربما يعود الى تعرض هذه الفطريات الى حالة من حالات الشد stress تحفزها على زيادة انتاج الكونيدات (Muhasin 1990).



قيمة الـ LSD للفطريات = 10.47، للتركيز = 7.91، معاملات التداخل = 20.94. شكل (3-35) تأثير راشح *P. fluorescens* على عدد الكونيدات في الفطريات الصائفة للنيماتود.

### 7-3: استخدام تقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) لتشخيص

#### عزلات الفطريات الصائدة للنيما تود

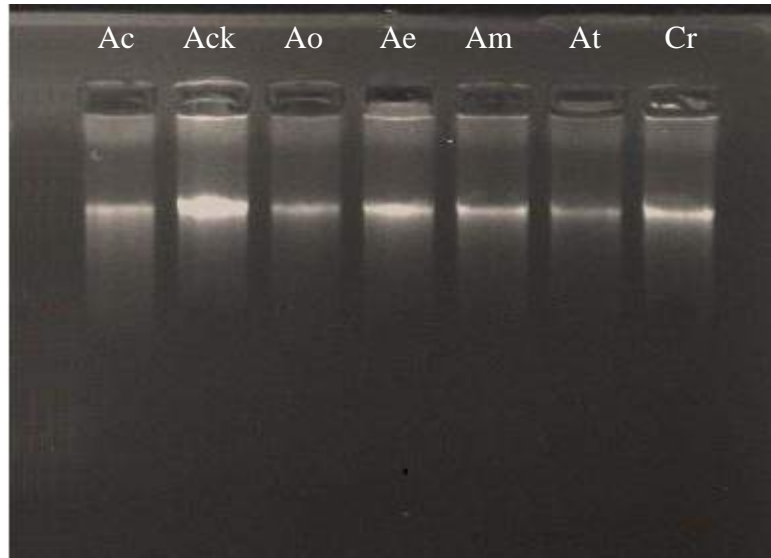
تم استخلاص الـ DNA 7 أنواع من الفطريات الصائدة للنيما تود حيث استخدمت في الدراسة الجزيئية (ITS) وهي كالاتي:

جدول (3-3) التشخيص الجزيئي للفطريات الصائدة للنيما تود المختبرة

Appendix	نسبة التعريف %	نسبة التطابق %	اسم العزلة المطابقة في بنك الجينات	اسم العزلة
6	99	86	KX953548.1	<i>A.conoides</i>
4	98	93	KX953548.1	<i>A.eudermata</i>
3	97	92	KX953548.1	<i>A.microscaphoides</i>
2	99	95	KR106995.1	<i>A.oligospora</i>
7	98	91	KX953548.1	<i>A.thaumasia</i>
1	98	93	AY773456.1	<i>D.brochopaga</i>
5	99	99	KR183785.1	<i>C.rosea</i>

\*ملحقات الجدول مرفقة في الـ Appendix

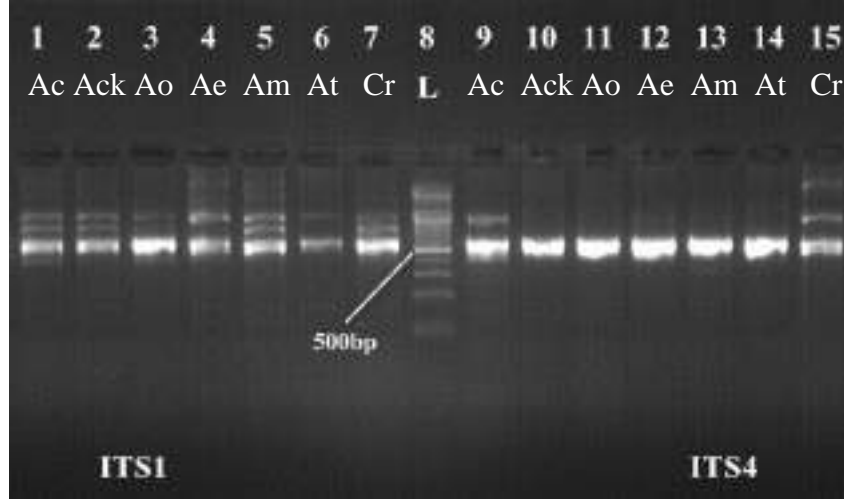
تم ملاحظة حزم الـ DNA بتقنية الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز شكل (3-36)



شكل (3-36) حزم الـ DNA الناتجة من الترحيل الكهربائي لعزلات الفطريات الصائدة للنيما تود على هلام الأكاروز.

## 8-3: استخدام ITS1 و ITS4

عند تضخيم الـ DNA للفطريات الصائفة للنيما تود المدروسة وذلك باستخدام البادئات ITS1 و ITS4 في تفاعل الـ PCR ظهرت الحزم في الموقع 500bp وذلك عند مقارنتها DNA Ladder شكل (37-3).



شكل (37-3) الترحيل الكهربائي بهلام الأكاروز لمنتج الـ PCR لمنطقة الـ ITS

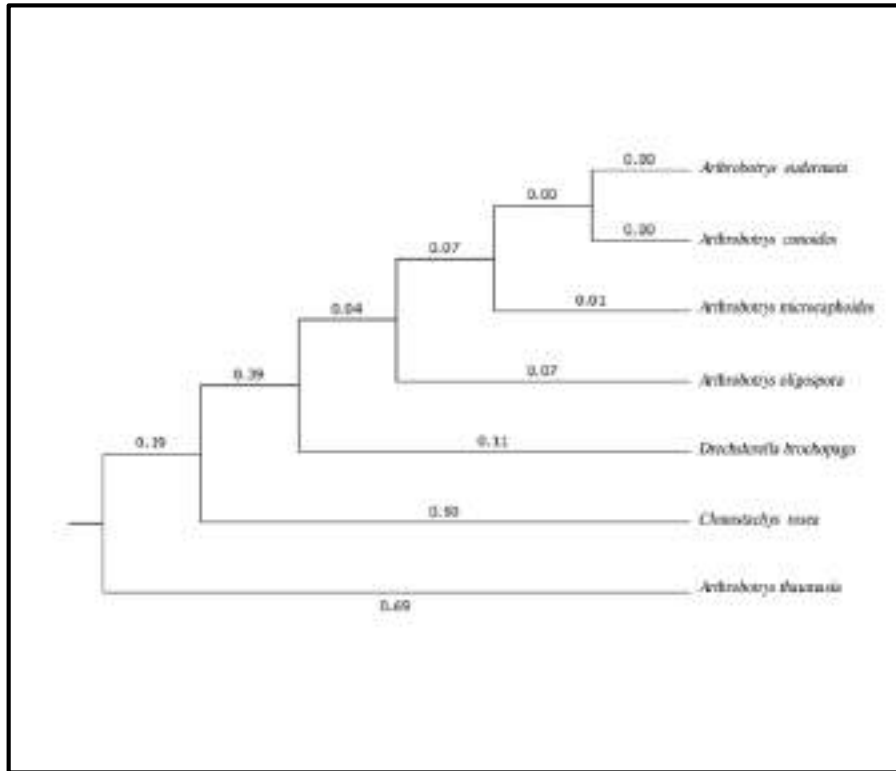
ان اعتماد الطرائق الجزيئية في تصنيف الفطريات أدى الى حل العديد من المشاكل والصعوبات في تشخيص الأنواع الفطرية التابعة لمجاميع مختلفة التي كانت ولا زالت تحصل عند استخدام التشخيص المظهري لها، حيث ان نتائج التحليل الجزيئي يعتمد على تسلسل القواعد النيتروجينية لـ DNA وهي الصفات الوراثية الثابتة لكل نوع فطري وبالتالي تعطي أوجه مقارنة بين الأنواع المراد تشخيصها (Weber, 2009).

أظهرت نتائج تحليل تنابعات المادة الوراثية DNA للأنواع المدروسة عدم حصول تطابق في التصنيف المظهري مع الجزيئي في بعض الحالات فلو حظ ان هذه الأنواع تطابق فيها التشخيص المظهري مع الجزيئي وهي *D. brochopaga* و *A. oligospora* و *C. rosea* حيث تطابقت بنسبة 98-100% مع العزلات الموجودة في بنك الجينات NCBI ومن الأنواع التي لم يحصل فيها تطابق بل جميعها طبقت العزله KX953548.1 وبنسب قليلة تتراوح من (81-93) *A. microscaphoides* و *A. eudermata* و *A. cookedickison* و *A. conoides* و *A. thaumasia* جدول (3-3) ولكن عند مقارنتها مع اشكال الكونيدات وحجمها وعدد خلاياها وجد اختلاف كبير كما في الشكل (2-3) وذلك من خلال ملاحظتها في المجهر الضوئي لذا فان نسبة التطابق بين التشخيص المظهري والجزيئي لم يكن 100% وقد يعود ذلك الى ان الفطريات

الصائدة للنيما تود تتأثر بالعوامل البيئية المختلفة وقد يؤدي ذلك الى فقدان القدرة على تكوين الكونيدات بعد عملية إعادة الزرع المتعدد (Simmons, 2007).

ان اغلب التقنيات الجزيئية لا تستطيع التمييز بين الاطوار النشطة وغير النشطة للفطريات (Jeewon and Hyde, 2007)، بينما أشار (Swe et al., 2011) الى ان كل من طرق التصنيفات التقليدية والجزيئية لها إيجابيات وسلبيات لكن تبقى الطرق التقليدية لها بعض الإيجابيات تفوق الطرق الجزيئية في تقدير الاختلافات بين الفطريات، وبين (Li et al., 2014) يجب علينا ان لا نستخدم البيانات التي نحصل عليها من الطرق الجزيئية بمعزل عن البيانات الأخرى مثل الصفات المظهرية، لان ذلك قد يؤدي بالباحثين الى استنتاج أفكار خاطئة من الأشجار الوراثية (Phylogenetic trees).

### 3-9: الشجرة الوراثية لأنواع الفطريات الصائدة للنيما تود المدروسة



شكل (3-38) الشجرة الوراثية لأنواع الفطريات الصائدة للنيما تود المدروسة

اظهرت نتائج الشجرة الوراثية التي تم الحصول عليها من تطبيق برنامج MEGA المتخصصة برسم الخرائط الوراثية للفطريات المدروسة انها تتألف من تجمعين عشائريين رئيسيين شمل التجمع العشائري الأول *A.thaumasia* وشمل التجمع العشائري الثاني *C.rosea*

*A.microscaphoides* و *A.oligospora* و *Drechslerella brochopaga* و *A.eudermata* و *A.conoides* .

ويبين الشكل 3-39 ترتيب الاحماض الامينية لهذه الفطريات وحسب تتابع القواعد النيروجينية وتم الحصول عليها من خلال استخدام البرنامج (MEGA) حيث تشير الى ان الفطريات الأربعة الأولى في الشجرة الوراثية *A.eudermata* و *A.conoides* و *A.microscaphoides* و *A.oligospora* هي الأكثر اشتراكاً وتشابهاً في تتابع الاحماض الامينية مقارنةً بالفطريات الثلاثة الأخرى.

<i>Arthrobotrys eudermata</i>	STFCEPN_SFRFG*SG*GP*.*.*ASA*VST*ENL***SHV*TRIF *NQNFQQ*GSLGRID*--RTQRNAIVVWVNCRIQ*IIIE??FE
<i>Arthrobotrys conoides</i>	*TLCEPKQ_SFRFG*GP*.*WDPSA**ASTKQKNL-*VKT*V**PKFSNENQNFQQ*GSLGRID*--RTQRNAIVVWVNCRIQ*IIIE??FE
<i>Arthrobotrys microcaphoides</i>	TLCEPKNLFRFG**GP**.*P*PSA**VSTQPKNL-*VKT*V**PKFSNENQNFQQ*GSLGRID*--KTQRNAIF*VWVNCRIQ*IIIE??FE
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	*TLCEPKNLFRFG*GP*.*P*PSA*VSTQPKNL-*VKT*V**PKFSNENQNFQQ*GSLGRID*--RTQRNA-VAVWVNCRIQ*IIIE??FE
<i>Drechsterella brochopaga</i>	.*TA*---SRRSPM*-GPGTSLSTGDGS**TRFRGRPSLGSFGRS*.*S*HARFQR*-G-NDAQTGMPARILAG*--NVRSKIK*LNEFCFS
<i>Clonostachys rosea</i>	STLCEPKNLFRFG*GP*.*P*PSA*VSTQPKNL-*VKT*V**PKFSNENQNFQQ*GSLGRID*--RTQRNAIVVWVNCRIQ*IIIE??FE*
<i>Arthrobotrys thaumasia</i>	LTS-*TSSFFVFT*--CS*WGRAA??SLQL*NR---AGV*KQTCPG*-QNQR*LRGCNDAQDMPKGPMPG*--NVRSKTR*FTE??LQ

شكل (39-3) ترتيب الاحماض الامينية حسب نتائج تتابع القواعد التروجينية ( sequence )

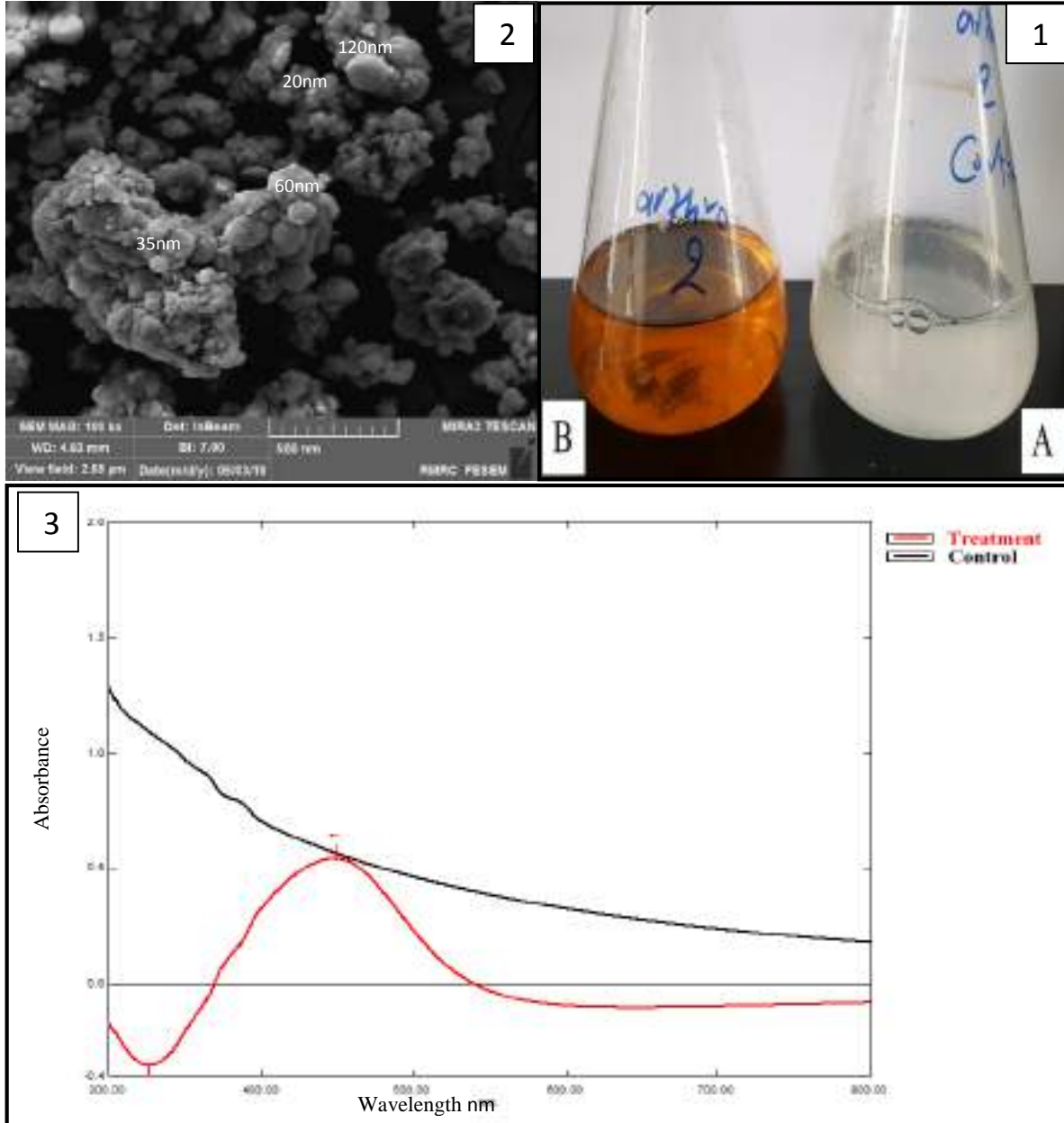
## 3-10: إنتاج الجسيمات النانوية من الفطريات المدروسة

عند دراسة قابلية الفطريات الصائفة للنيما تود على تكوين اجسام نانوية أظهرت الدراسة قابلية هذه الفطريات على إنتاج هذه الاجسام، وقد بينت نتائج طيف الاشعة UV-Visible spectroscopy عند الاطوال الموجية (300-800) نانومتر والمسجلة بعد 72 ساعة ظهور قمم امتصاصية مختلفة وفي اطوال موجية محددة حيث اظهر الفطر *A.conoides* اعلى قمة عند الطول الموجي 448 نانومتر وبقيمة امتصاصية 0.5 وحجم بعض الجسيمات النانوية (20، 35، 60، 120 nm) كما موضح في شكل (3-40)، كما اظهر *A.cookedickison* اعلى قمة عند الطول الموجي 447 نانومتر وبقيمة امتصاصية 0.3 وحجم بعض الجسيمات النانوية (10، 35، 55، 75 nm) شكل (3-41)، اما الفطر *A.eudermata* اعلى قمة عند الطول الموجي 449.5 نانومتر وبقيمة امتصاصية 0.4 وحجم بعض الجسيمات النانوية (5، 10، 16، 35 nm) شكل (3-42)، *A.microscaphoides* اعلى قمة عند الطول الموجي 451.5 نانومتر وبقيمة امتصاصية 0.3 وحجم بعض الجسيمات النانوية (15، 30، 35، 45، 65 nm) شكل (3-43)، واطهر الفطر *A.oligospora* اعلى قمة عند الطول الموجي 433.5 نانومتر وبقيمة امتصاصية 0.3 وحجم بعض الجسيمات النانوية (10، 15، 30، 60، 75 nm) شكل (3-44) اما الفطر *A.thaumasia* اعلى قمة عند الطول الموجي 435 نانومتر وبقيمة امتصاصية 0.3 وحجم بعض الجسيمات النانوية (20، 30، 40، 85، 95 nm) شكل (3-45)، اما الفطر *C.rosea* اعلى قمة عند الطول الموجي 448.5 نانومتر وبقيمة امتصاصية 0.5 وحجم بعض الجسيمات النانوية (8، 10، 25، 65 nm) شكل (3-46)، في حين لم يظهر راشح المزارع الغير معاملة بنترات الفضة والمستخدم كعامل سيطرة أي قمم امتصاصية عند الاطوال (300-800) نانومتر.

ان التوجه الحديث لاستخدام الفطريات كمصادر طبيعية لإنتاج الجسيمات النانوية نال اهتماماً كبيراً من قبل الباحثين في العالم، ان وحدات البناء الأساسية لتقنية النانو هي الجسيمات النانوية nanoparticles حيث انصب الاهتمام نحو الطرق البيولوجية لتصنيع المواد النانوية لكونها امنة وصديقة للبيئة وغير خطيرة لذا كانت الفطريات اكثرها استخداماً كأدوات لتصنيع الجسيمات النانوية (Silambarasan et al., 2013).

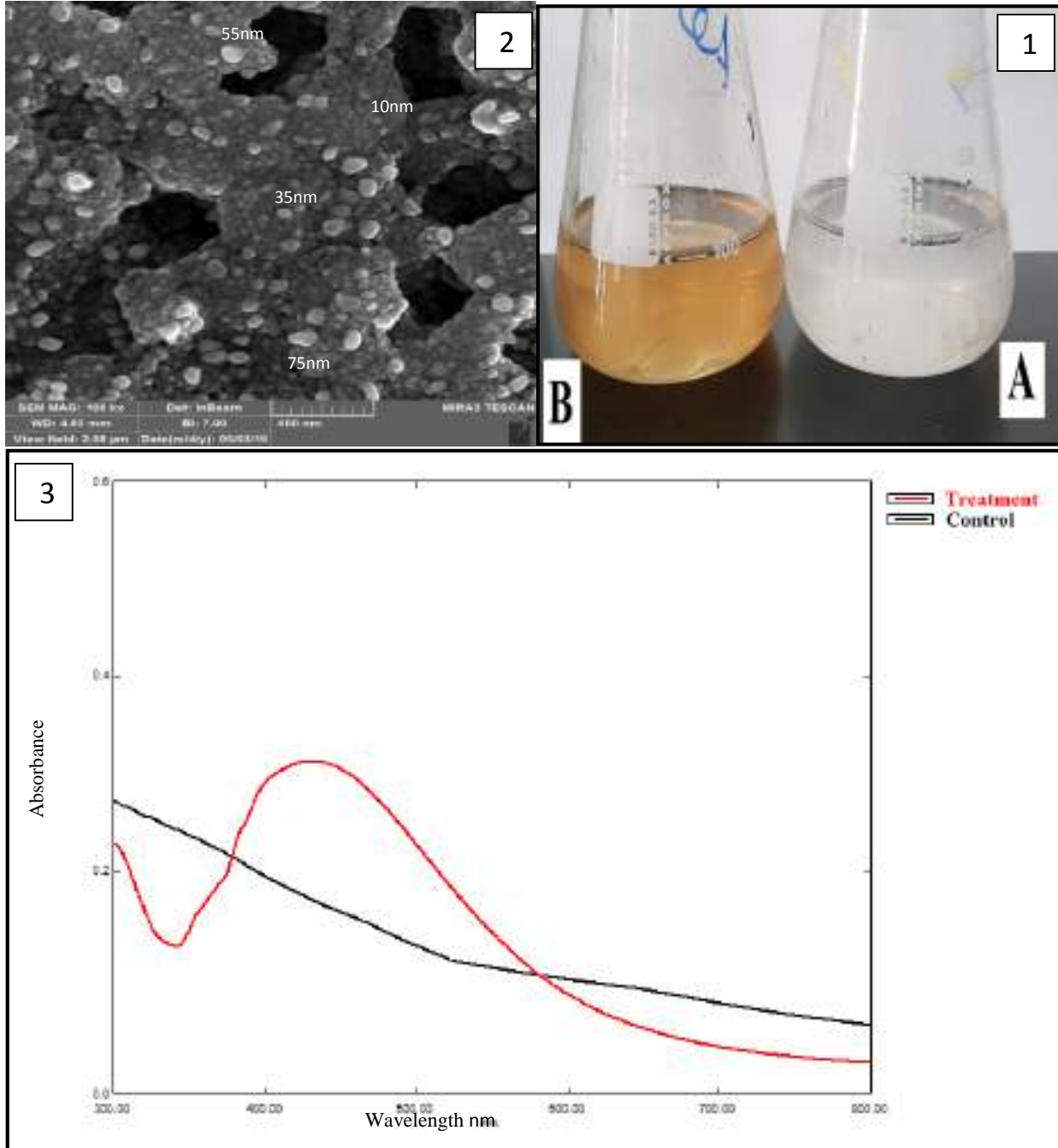
يعتبر طيف الاشعة فوق البنفسجية وسيلة جيدة للكشف عن جسيمات الفضة النانوية في المحلول حيث ان الامتصاصية عادة ترتبط بالحجم والابعاد للجسيمات النانوية كما ان تحديد شكل وحجم الجسيمات يتم من خلال تحديد موقع الامتصاصية عند الاطوال الموجية (Fayaz et al.,

(2009)، ان عملية البناء الحيوي لجسيمات الفضة النانوية وموقع الامتصاصية عند الاطوال الموجية يختلف باختلاف الأنواع الفطرية (Nayak et al., 2015).

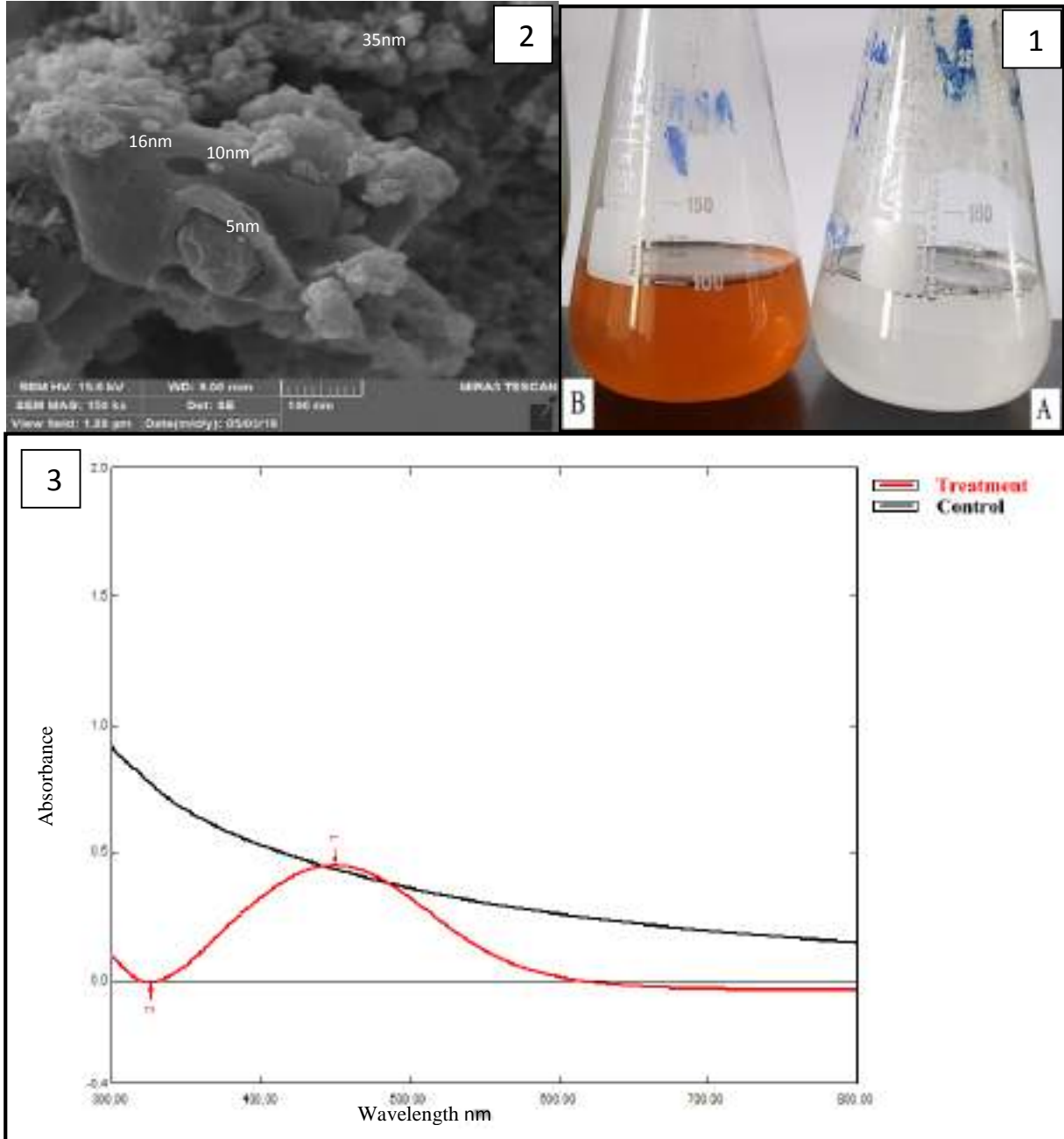


شكل (3-40) يوضح (1) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر *A. conoides* بعد 72 ساعة من الحضانة: A: راشح المزرعة غير المعامل بـ  $AgNO_3$  (السيطرة). B: راشح المزرعة الحاوي على جسيمات الفضة النانوية. (2) صور المجهر الإلكتروني الماسح للجسيمات النانوية AgNPs المنتجة من الفطر *A. conoides* (3) طيف الأشعة فوق البنفسجية - المرئية للفطر *A. conoides* بعد مرور 72 ساعة من الحضانة باستخدام راشح المزرعة الفطرية كعامل سيطرة.

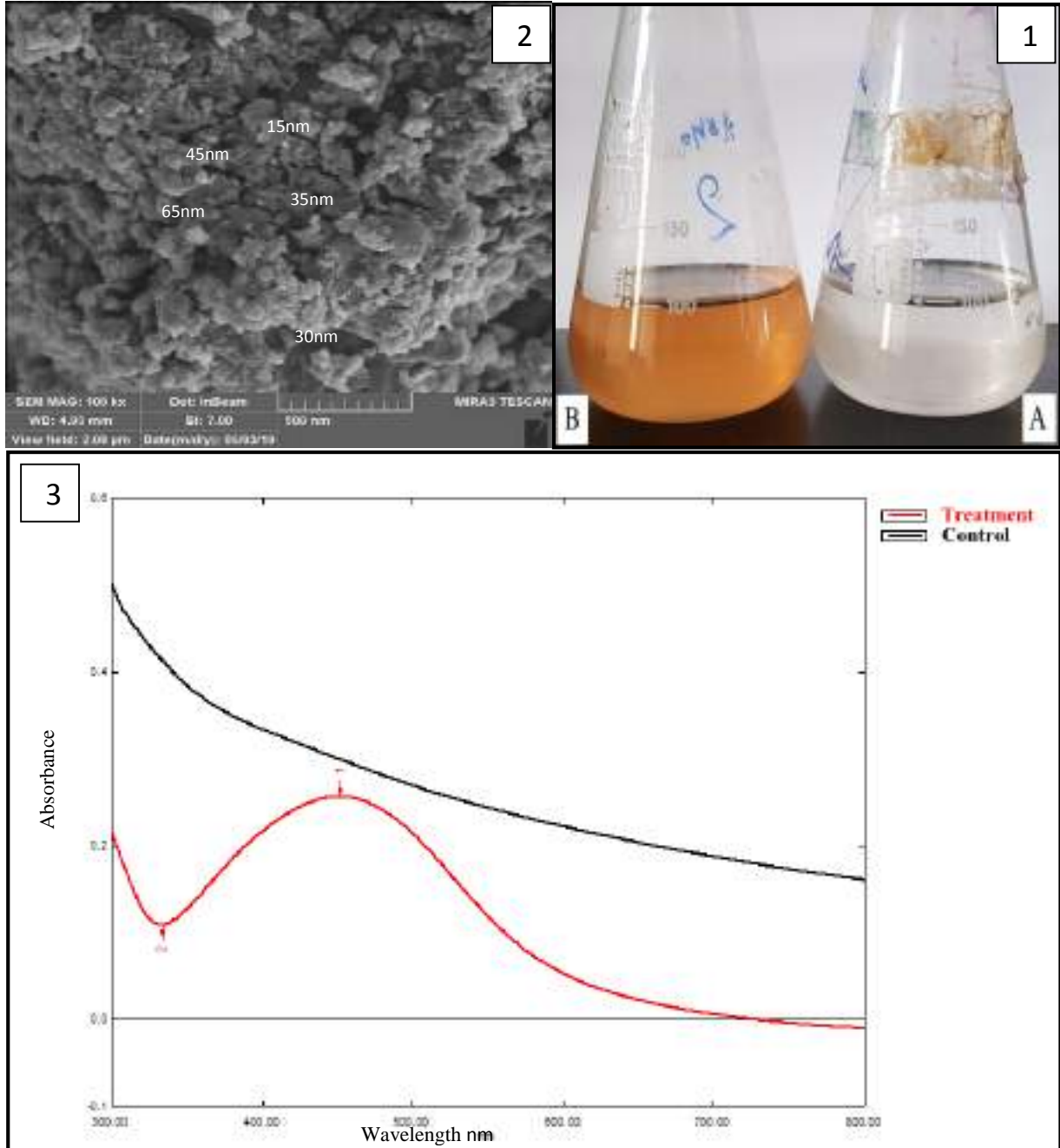




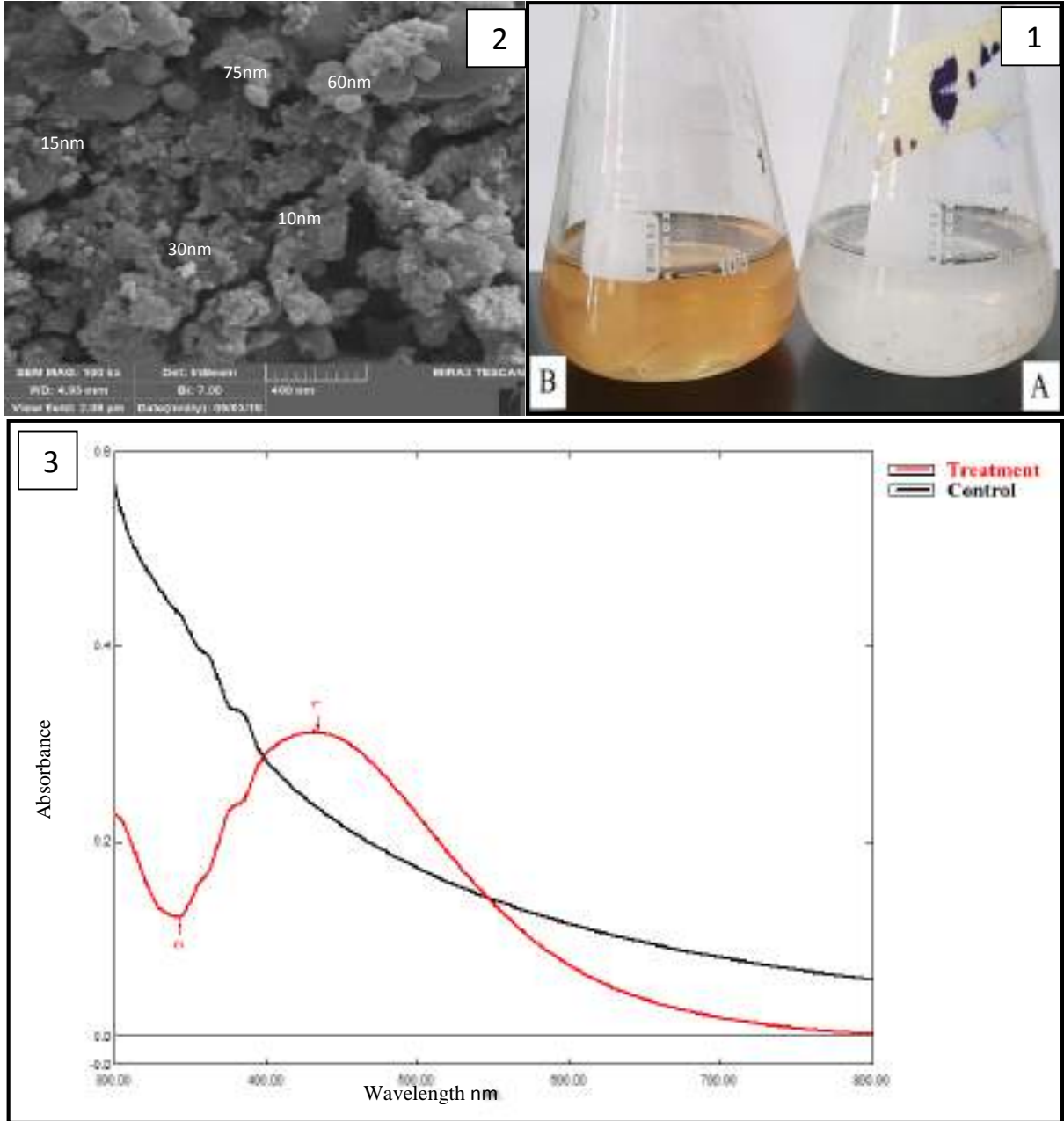
شكل (3-41) يوضح (1) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر *A. cookedickison* بعد 72 ساعة من الحضن A: راسح المزرعة غير المعامل بـ  $AgNO_3$  (السيطرة). B: راسح المزرعة الحاوي على جسيمات الفضة النانوية. (2) صور المجهر الالكتروني الماسح للجسيمات النانوية AgNPs المنتجة من الفطر *A. cookedickison* (3) طيف الاشعة فوق البنفسجية - المرئية للفطر *A. cookedickison* بعد مرور 72 ساعة من الحضن باستخدام راسح المزرعة الفطرية كعامل سيطرة.



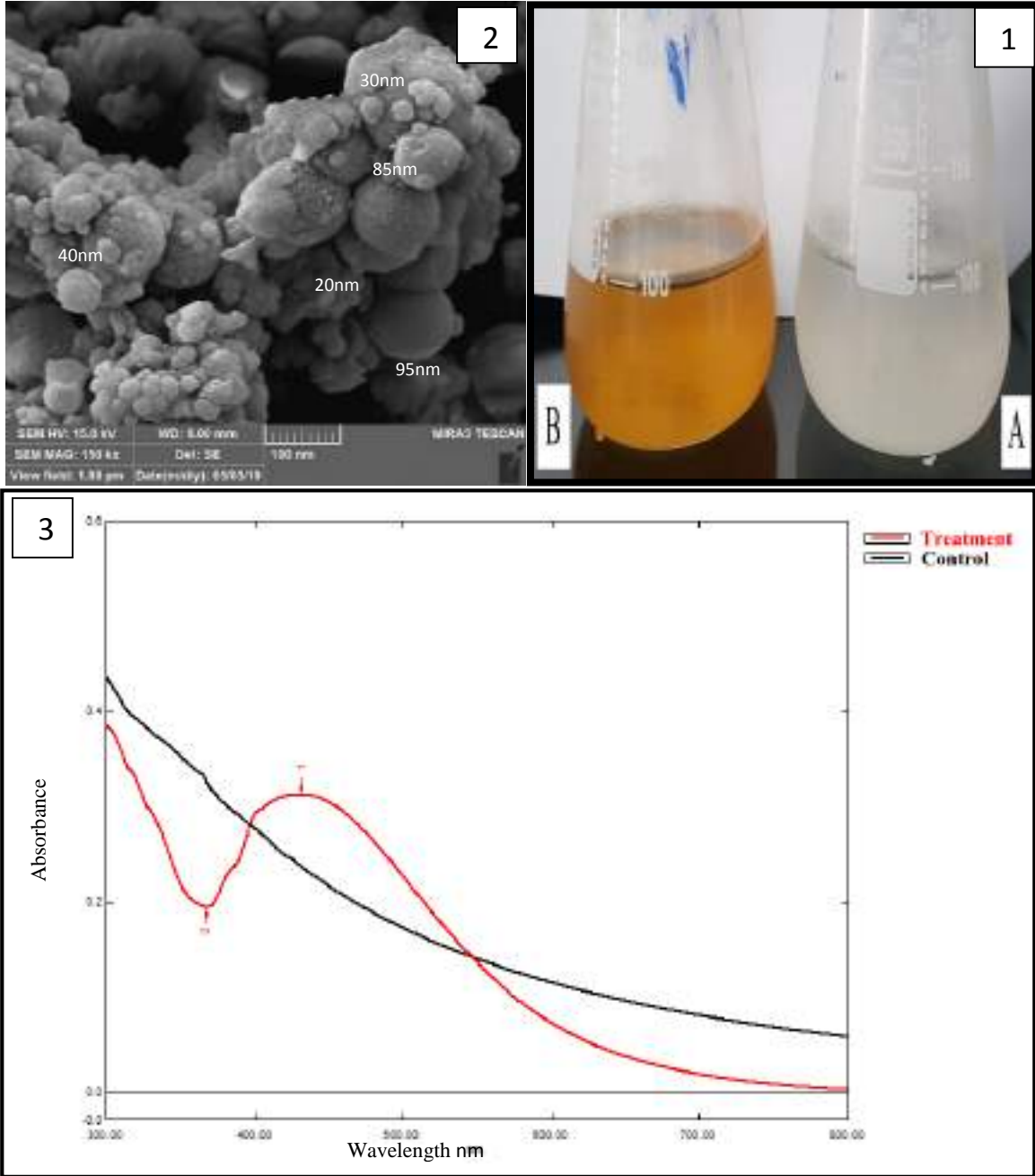
شكل (3-42) يوضح (1) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر *A.eudermata* بعد 72 ساعة من الحضانة A: راشح المزرعة غير المعامل بـ  $AgNO_3$  (السيطرة). B: راشح المزرعة الحاوي على جسيمات الفضة النانوية. (2) صور المجهر الإلكتروني الماسح للجسيمات النانوية AgNPs المنتجة من الفطر *A.eudermata* (3) طيف الأشعة فوق البنفسجية - المرئية للفطر *A.eudermata* بعد مرور 72 ساعة من الحضانة باستخدام راشح المزرعة الفطرية كعامل سيطرة.



شكل (3-43) يوضح (1) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر *A. microscaphoides* بعد 72 ساعة من الحضانة: A: رشح المزرعة غير المعامل بـ  $AgNO_3$  (السيطرة). B: رشح المزرعة الحاوي على جسيمات الفضة النانوية. (2) صور المجهر الالكتروني الماسح للجسيمات النانوية AgNPs المنتجة من الفطر *A. microscaphoides*. (3) طيف الأشعة فوق البنفسجية - المرئية للفطر *A. microscaphoides* بعد مرور 72 ساعة من الحضانة باستخدام رشح المزرعة الفطرية كعامل سيطرة.

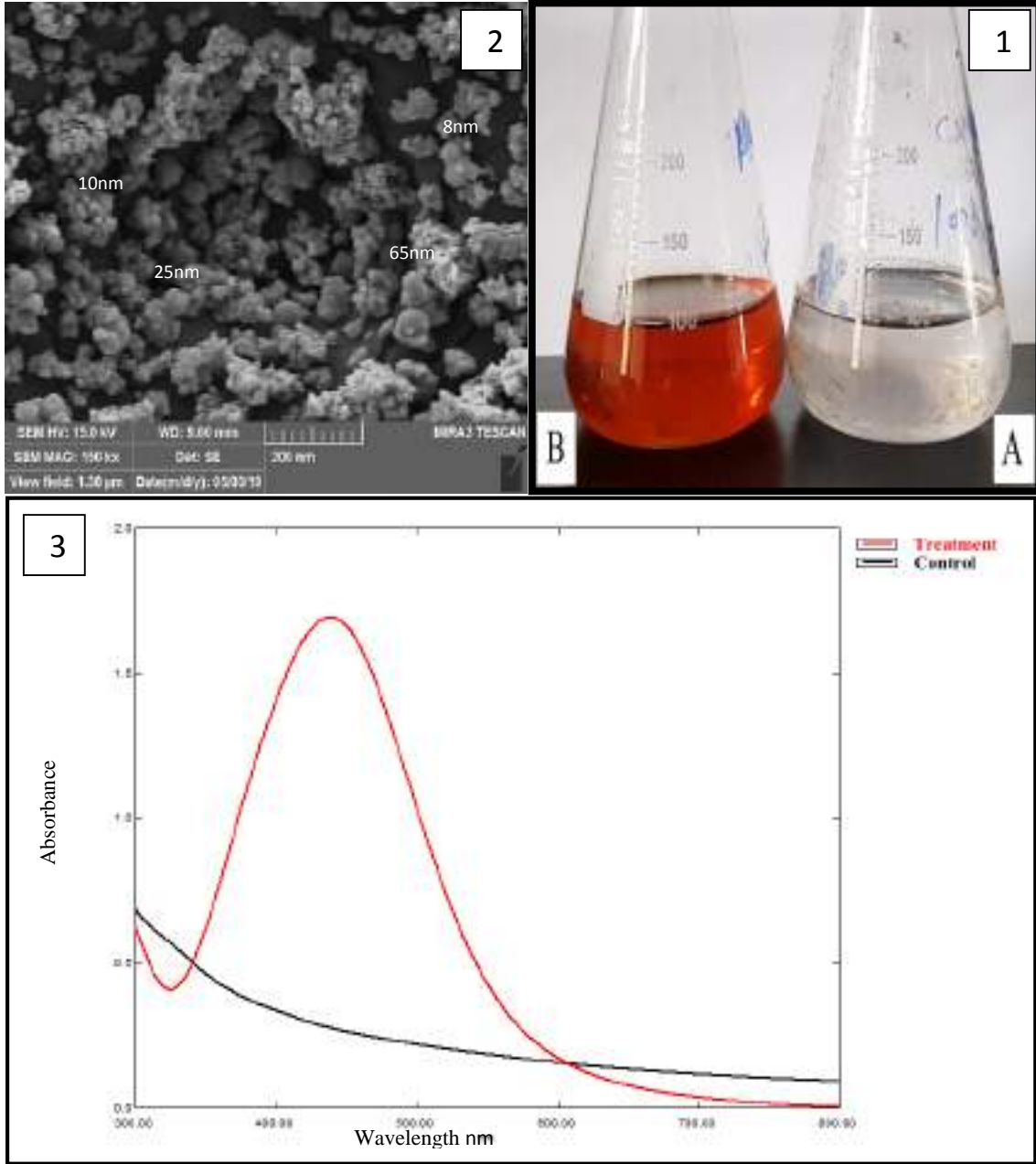


شكل (3-44) يوضح (1) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر *A. oligospora* بعد 72 ساعة من الحضانة A: راشح المزرعة غير المعامل بـ  $AgNO_3$  (السيطرة). B: راشح المزرعة الحاوي على جسيمات الفضة النانوية. (2) صور المجهر الإلكتروني الماسح للجسيمات النانوية AgNPs المنتجة من الفطر *A. oligospora* (3) طيف الأشعة فوق البنفسجية - المرئية للفطر *A. oligospora* بعد مرور 72 ساعة من الحضانة باستخدام راشح المزرعة الفطرية كعامل سيطرة.



شكل (3-45) يوضح (1) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر *A.thaumasia* بعد 72 ساعة من الحضانة A: راشح المزرعة غير المعامل بـ  $AgNO_3$  (السيطرة). B: راشح المزرعة الحاوي على جسيمات الفضة النانوية. (2) صور المجهر الإلكتروني الماسح للجسيمات النانوية AgNPs المنتجة من الفطر *A.thaumasia* (3) طيف الأشعة فوق البنفسجية - المرئية للفطر *A.thaumasia* بعد مرور 72 ساعة من الحضانة باستخدام راشح المزرعة الفطرية كعامل سيطرة.





شكل (3-46) يوضح (1) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر *C.rosea* بعد 72 ساعة من الحضانة A: راسح المزرعة غير المعامل بـ  $AgNO_3$  (السيطرة). B: راسح المزرعة الحاوي على جسيمات الفضة النانوية. (2) صور المجهر الإلكتروني الماسح للجسيمات النانوية AgNPs المنتجة من الفطر *C.rosea* (3) طيف الأشعة فوق البنفسجية - المرئية للفطر *C.rosea* بعد مرور 72 ساعة من الحضانة باستخدام راسح المزرعة الفطرية كعامل

الفطريات هي مصادر طبيعية للجزيئات الحيوية النانوية وقد طبقت مؤخراً على نطاق واسع في مجالات متعددة بما في ذلك العلاج الطبي (Karbasian *et al.*, 2008). ركزت البحوث خلال العقد الماضي على التركيب الحيوي للجزيئات النانوية المعدنية بواسطة الفطريات كمصادر طبيعية (Karbasian *et al.*, 2008). تعتبر جسيمات الفضة النانوية ذات أهمية خاصة في تطبيقات العلاج الطبي، وحتى الآن تم إجراء عدد من التجارب على الفطريات لإنتاج الجسيمات النانوية كعامل مضاد للميكروبات (Kashyap *et al.*, 2013; Fayaz *et al.*, 2009; Mukherjee *et al.*, 2013)

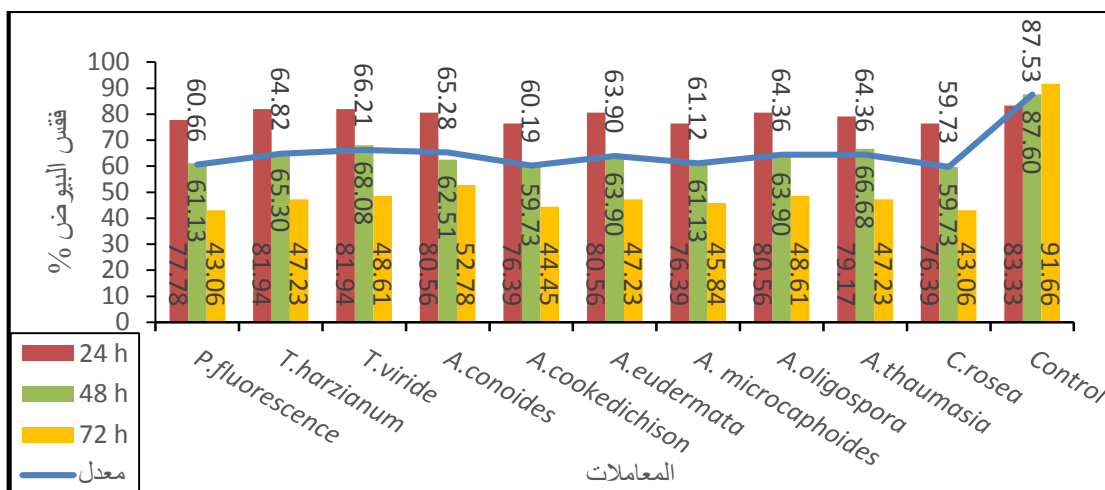
في الدراسة الحالية تم استخدام تقنية النانو في مجال التصنيف حيث تم اختبار أنواع الفطريات الصائدة للنيما تود المختبرة في قابليتها على البناء الحيوي لجسيمات الفضة النانوية والكشف عنها وتشخيصها باستخدام طيف الأشعة فوق البنفسجية والمجهر الإلكتروني الماسح SEM، وبعد انماء أنواع الفطريات الصائدة للنيما تود تحت ظروف معينة أظهرت الأنواع *A.conoides*، *A.oligospora*، *A.microscaphoides*، *A.eudermata*، *A.cookedickison*، *A.thaumasia*، *C.rosea* نتائج موجبة حيث تم ملاحظة التغيرات اللونية في راسح المزارع المعاملة من اللون الأبيض إلى اللون البني وهذا دليل على حدوث عملية الاختزال الحيوي (Bioreduction) لأيونات الفضة وتكوين جسيمات الفضة النانوية للراسح الفطري، وتم الكشف عن التغير اللوني بواسطة طيف الأشعة فوق البنفسجية بعد مرور 72 ساعة من الحضانة وعند الأطوال الموجية (300-800) نانومتر حيث أظهر النوع *A.microscaphoides* أعلى قمة امتصاصية عند الطول الموجي 451.5، وأظهرت الأنواع *A.eudermata* و *C.rosea* و *A.conoides* و *A.cookedickison* و *A.thaumasia* عند الأطوال الموجية 449.5، 448.5، 448، 447، 335 على التوالي في حين أظهر النوع *A.oligospora* أعلى امتصاصية عند الطول الموجي 433.5 وهذا يتفق مع دراسات سابقة (Wang *et al.*, ; Yamagami *et al.*, 1998; Costa Silva *et al.*, 2017، 2015، 2013) حيث توصل الباحثون على أن جسيمات الفضة النانوية تنتج من وجود الأحماض الأمينية *phenylalanine*، *cysteine*، *alanine*، *tyrosine*، *arginine* المكونة للأنزيم *chitinase* المفرز من الفطريات الصائدة للنيما تود، كما أشارت الدراسة من خلال معرفه الأحماض الامينية التي تكونها الفطريات المختبرة بعد تحديدها ببرنامج (MEGA) من خلال معرفة التتابعات الجينية حيث لوحظ وجود الأحماض الامينية والتي تتفق مع دراسات كثيرة بكونها تتحد مع ايونات الفضة لتكوين الجسيمات النانوية.

ان تشخيص الفطريات الصائدة للنيما تود بالاعتماد على الوصف المظهري وبالأساس على شكل الكونيدات يخلق صعوبة بسبب التنوع الكبير ضمن النوع الواحد كذلك فان الصفات المجهرية تتأثر بالعوامل البيئية والتي لا تتوافق مع الظروف المختبرية، لذا فان الهدف الأساسي للدراسة الحالية هو التشخيص مظهرياً وجزئياً لأنواع هذه الفطريات والكشف عن انتاج جسيمات الفضة النانوية مما يعطي صفات إضافية دقيقة في تشخيص مثل هذه الأنواع من الفطريات (Martinez-Castanon et al., 2008).

### 11-3: تأثير روائح الفطريات الصائدة للنيما تود والفطرين *T.harzianum* و *T.viride* والبكتريا *P.fluorescens* على فقس البيوض وموت يرقات الطور

#### الثاني لديان العقد الجذرية. *Meloidogyne sp.*

أوضحت نتائج الدراسة في شكل 3-47 ان اقل معدل لفقس البيوض للفطر *C.rosea* وبمعدل 59.73% والتي اختلفت معنويًا عن معاملة السيطرة وتلاه الفطر *T.harzianum* و *A.conoides* حيث بلغت 64.82 و 65.28% في حين اعلى معدل لفقس بيوض النيما تود ظهرت في البكتريا *T.viride* وبلغت 66.21%. كان اقل معدل لفقس البيوض عند 72 ساعة وبلغ 50.89% واعلى معدل لفقس البيوض عند 24 ساعة وبلغ 79.55%.



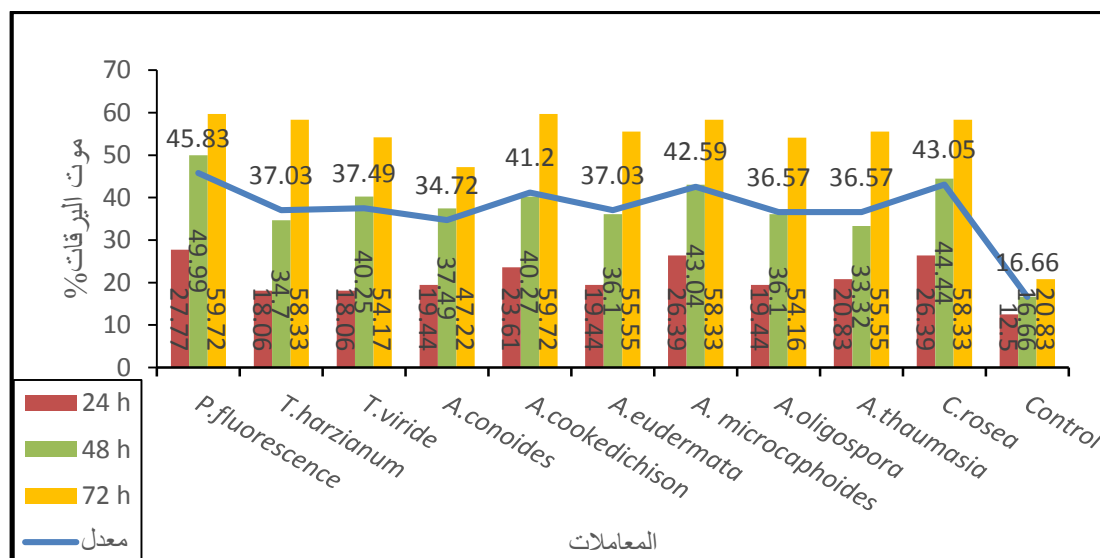
قيمة ال-LSD المؤثر = 30.35، للوقت = 15.84، معاملات التداخل = 52.55

شكل (3-47) تأثير روائح الفطريات الصائدة للنيما تود والفطرين *T.harzianum* و *T.viride* والبكتريا *P.fluorescens* على فقس بيوض ديوان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

أوضحت نتائج الدراسة في شكل 3-48 ان اعلى معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود ظهرت في البكتريا *P.fluorescens* والفطر *C.rosea* حيث بلغا 45.83 و 43.05% لكل منهما على التوالي والتي اختلفت معنويًا عن معاملة السيطرة وتلاه الفطر *A.microscaphoides*



حيث بلغ 42.59% في حين كان اقل تأثير للفطر *A.conoides* حيث بلغ المعدل 34.72%، اما اعلى معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود كان عند 72 ساعة والذي بلغ 52.90% واقل معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود كان عند 24 ساعة والذي بلغ 21.08%.



قيمة الـ LSD المؤثر = 4.479، قيمة الـ LSD للوقت = 2.339، معاملات التداخل = 7.758

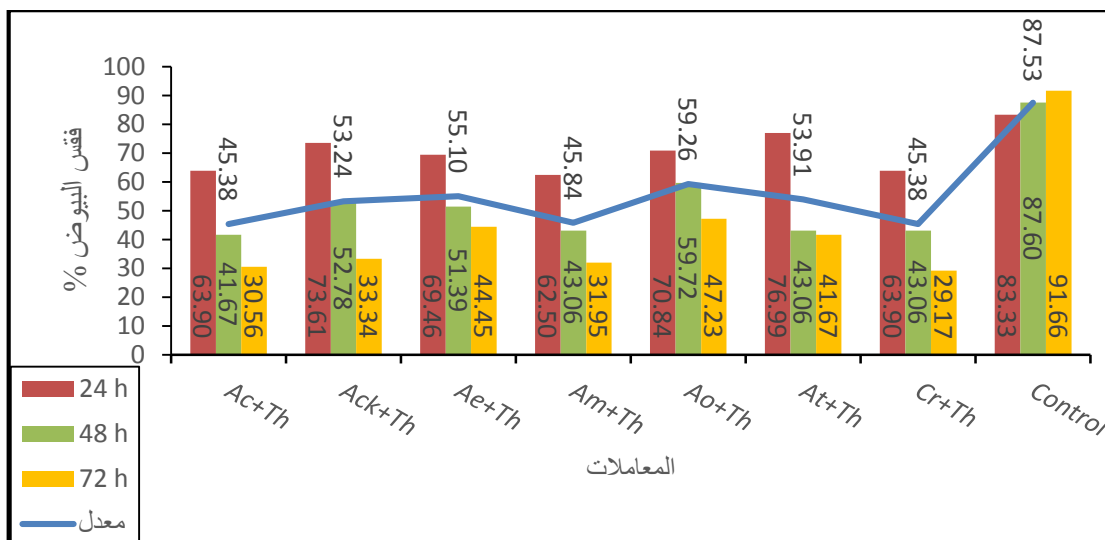
شكل (3-48) تأثير راشح الفطريات الصائفة للنيما تود والفطرين *T.harzianum* و *T.viride* والبكتريا *Meloidogyne sp.* على موت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية

### 12-3: تأثير مزيج من راشح الفطر *T.harzianum* مع رواشح الفطريات الصائفة

للنيما تود على فقس البيوض وموت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية

#### *Meloidogyne sp.*

أوضحت نتائج الدراسة في شكل 3-49 ان اقل معدل لفقس بيوض النيما تود ظهرت في Cr+Th حيث بلغ 45.38% والتي اختلفت معنويا عن معاملة السيطرة وتلاه At+Th و Ae+Th و 53.91 و 55.10% على التوالي في حين اعلى تأثير Ao+Th وبمعدل 59.26%. كان اقل معدل لفقس البيوض عند 72 ساعة وبلغ 43.75% واعلى معدل لفقس البيوض عند 24 ساعة وبلغ 70.57%.



قيمة الـ LSD المؤثر = 14.402، قيمة الـ LSD للوقت = 8.819، معاملات التداخل = 26.42

شكل (3-49) تأثير مزيج من راشح الفطر *T.harzianum* مع روائح الفطريات الصائدة للنيما تود على فقس بيوض ديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

أوضحت نتائج الدراسة في شكل 3-50 ان اعلى معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود ظهرت في Ack+Th وبلغت 64.81% والتي اختلفت معنويا عن معاملة السيطرة وتلاه Ac+Th (58.79%) في حين اقل معدل موت ظهر في المعاملة Ae +Th وبمعدل 52.77%. كان اعلى معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود عند 72 ساعة والذي بلغ 65.45% واقل معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود عند 24 ساعة والذي بلغ 41.32%.



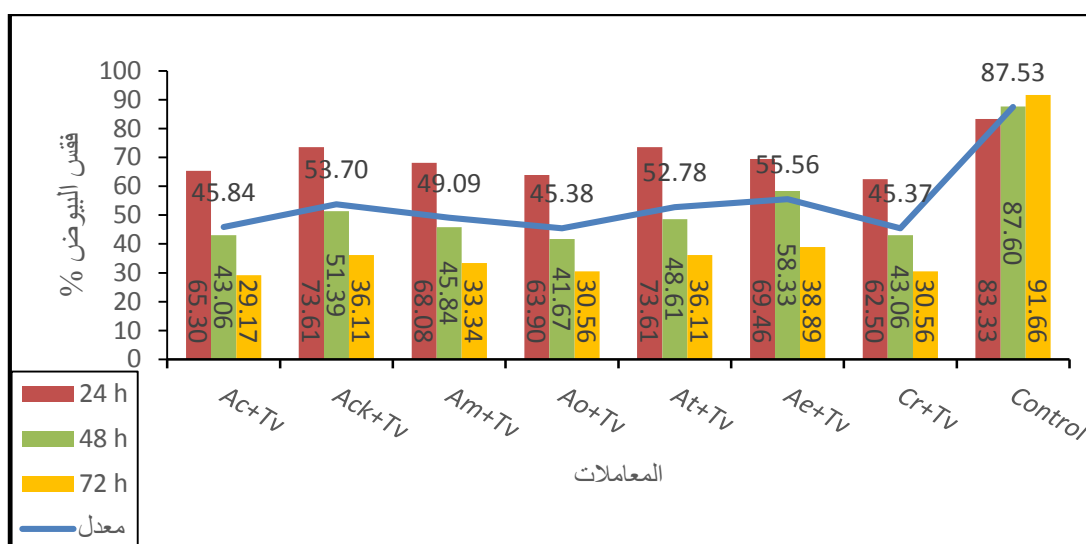
قيمة الـ LSD المؤثر = 4.537، قيمة الـ LSD للوقت = 2.778، معاملات التداخل = 7.858

شكل (3-50) تأثير مزيج من راشح الفطر *T.harzianum* مع روائح الفطريات الصائدة للنيما تود على موت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

### 13-3: تأثير مزيج من راشح الفطر *T.viride* مع رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود على فقس البيوض وموت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية

#### *Meloidogyne sp.*

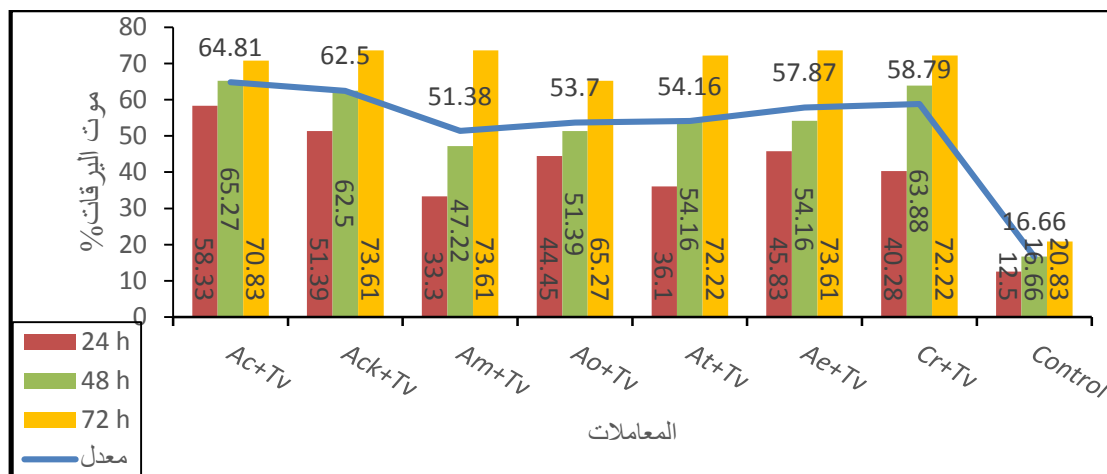
أوضحت نتائج الدراسة في شكل 3-51 ان اقل معدل لفقس بيوض النيما تود ظهرت في *Cr+Tv* وبلغت 45.37% والتي اختلفت معنوياً عن معاملة السيطرة وتلاه *At+Tv* و *Ack+Tv* حيث بلغت 52.78 و 53.70% لكل منهما على التوالي في حين اعلى تأثير *Ae +Tv* وبمعدل 55.56%. كان اقل معدل لفقس البيوض عند 72 ساعة وبلغ 40.80% واعلى معدل لفقس البيوض عند 24 ساعة وبلغ 69.97%.



قيمة الـ LSD المؤثر = 13.89، قيمة الـ LSD للوقت = 8.51، معاملات التداخل = 25.49

شكل (3-51) تأثير مزيج من راشح الفطر *T.viride* مع رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود على فقس بيوض ديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

أوضحت نتائج الدراسة في شكل 3-52 ان اعلى معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود ظهرت في *Ac +Tv* و *Ack+Tv* وبلغت 64.81 و 62.50% لكل منهما على التوالي والتي اختلفت معنوياً عن معاملة السيطرة وتلاه *Cr+Tv* 58.79% في حين اقل تأثير كان في *Am+Tv* وبمعدل 51.38%. كان اعلى معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود عند 72 ساعة والذي بلغ 65.28% واقل معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود عند 24 ساعة والذي بلغ 40.27%.



قيمة الـ LSD المؤثر = 4.746، قيمة الـ LSD للوقت = 2.906، معاملات التداخل = 8.220

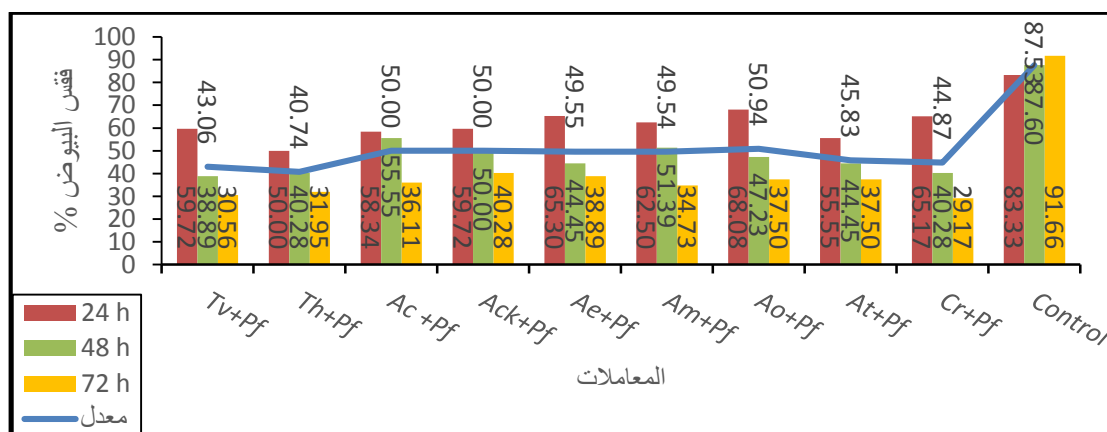
شكل (3-52) تأثير مزيج من راشح الفطر *T. viride* مع رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود على موت يرقات *Meloidogyne sp.* L2 في الجذور.

### 14-3: تأثير مزيج من راشح البكتريا *P. fluorescens* مع رواشح الفطريات

الصائدة للنيما تود والفطرين *T. viride* و *T. harzianum* على فقس البيوض

وموت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

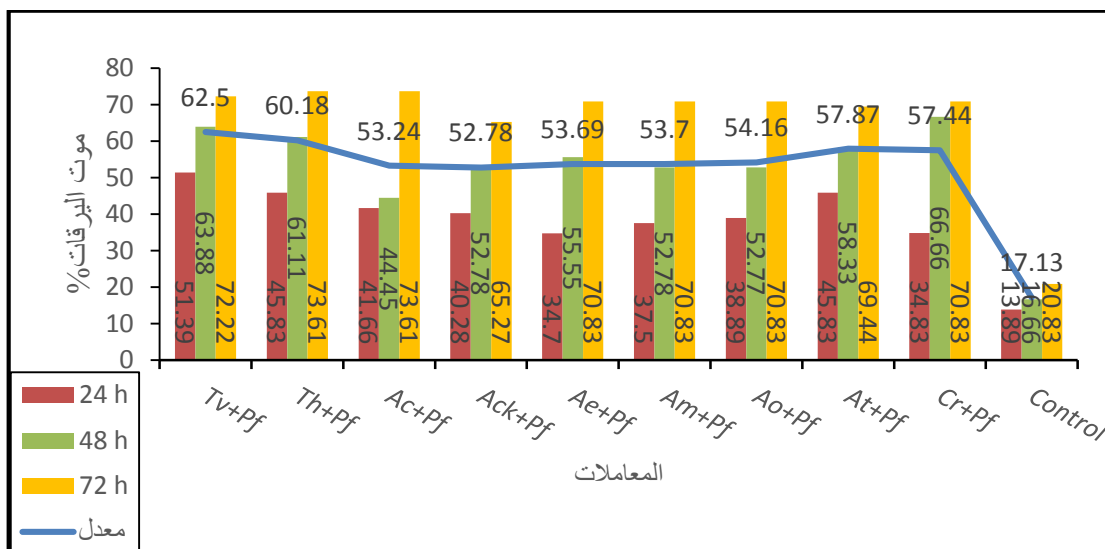
أوضحت نتائج الدراسة في شكل 3-53 ان اقل معدل لفقس بيوض النيما تود ظهرت في Th+Pf وبمعدل 40.74% وتلاه الفطر Ack+Pf و Ac+Pf و 50.00% و 50.00% على التوالي في حين اعلى تأثير في Ao+Pf وبلغت 50.94% والتي اختلفت معنويا عن معاملة السيطرة. كان اقل معدل لفقس البيوض عند 72 ساعة وبلغ 40.84% و اعلى معدل لفقس البيوض عند 24 ساعة وبلغ 62.77%.



قيمة الـ LSD المؤثر = 11.55، قيمة الـ LSD للوقت = 6.326، معاملات التداخل = 20.34

شكل (3-53) تأثير مزيج من راشح البكتريا *P. fluorescens* مع رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود والفطرين *T. viride* و *T. harzianum* على فقس بيوض ديديان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

أوضحت نتائج الدراسة في شكل 3-54 ان اعلى معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود ظهرت في Tv+Pf و Th+Pf وبلغت 62.50 و 60.18% والتي اختلفت معنويا عن معاملة السيطرة وتلاه At+Pf على التوالي في حين اقل تأثير Ack+Pf وبمعدل 52.78%. كان اعلى معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود عند 72 ساعة والذي بلغ 65.83% واقل معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود عند 24 ساعة والذي بلغ 38.48%.



قيمة الـ LSD المؤثر = 4.536، قيمة الـ LSD للوقت = 2.485، معاملات التداخل = 7.857

شكل (3-54) تأثير مزيج من راشح البكتريا *P. fluorescens* مع رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود والفطرين *T. harzianum* و *T. viride* على موت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

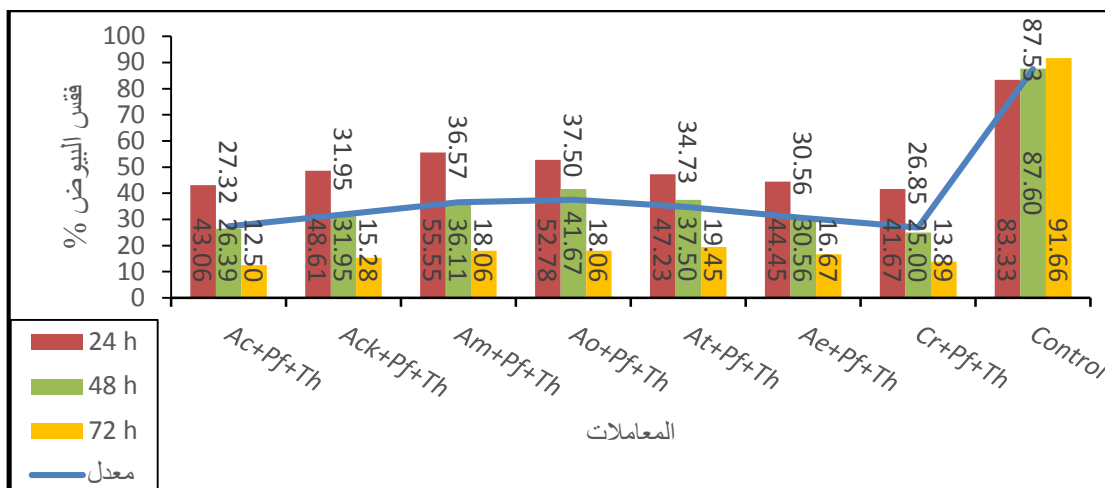
### 15-3: تأثير مزيج من راشح الفطر *T. harzianum* وراشح البكتريا

*P. fluorescens* مع رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود على فقس البيوض

#### وموت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

أوضحت نتائج الدراسة في شكل 3-55 ان اقل معدل لفقس بيوض النيماتود ظهرت في

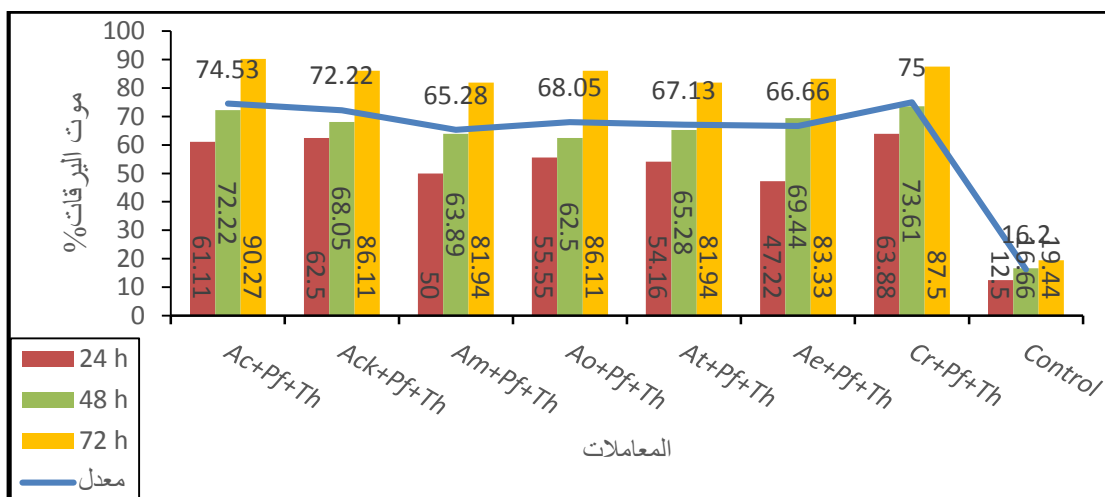
Cr+Pf+Th وبلغت 26.85% والتي اختلفت معنويا عن معاملة السيطرة وتلاه At+Pf+Th و Am+Pf+Th حيث بلغت 34.73 و 36.57% لكل منهما على التوالي في حين اعلى تأثير Ao+Pf+Th وبمعدل 37.50%. كان اقل معدل لفقس البيوض عند 72 ساعة وبلغ 25.70% واعلى معدل لفقس البيوض عند 24 ساعة وبلغ 52.09%.



قيمة الـ LSD المؤثر = 13.04، قيمة الـ LSD للوقت = 7.99، معاملات التداخل = 23.92

شكل (3-55) تأثير مزيج من راشح الفطر *T.harzianum* وراشح البكتريا *P.fluorescens* مع رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود على فقس بيوض ديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

أوضحت نتائج الدراسة في شكل 3-56 ان اعلى معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود ظهرت في Ac+Pf+Th و Cr+Pf+Th وبلغت 75.00 و 74.53% لكل منهما على التوالي والتي اختلفت معنويا عن معاملة السيطرة وتلاه Ack+Pf+Th 72.22% في حين اقل تأثير Am+Pf+Th وبمعدل 65.28%. كان اعلى معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود عند 72 ساعة والذي بلغ 77.08% واقل معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود عند 24 ساعة والذي بلغ 50.87%.



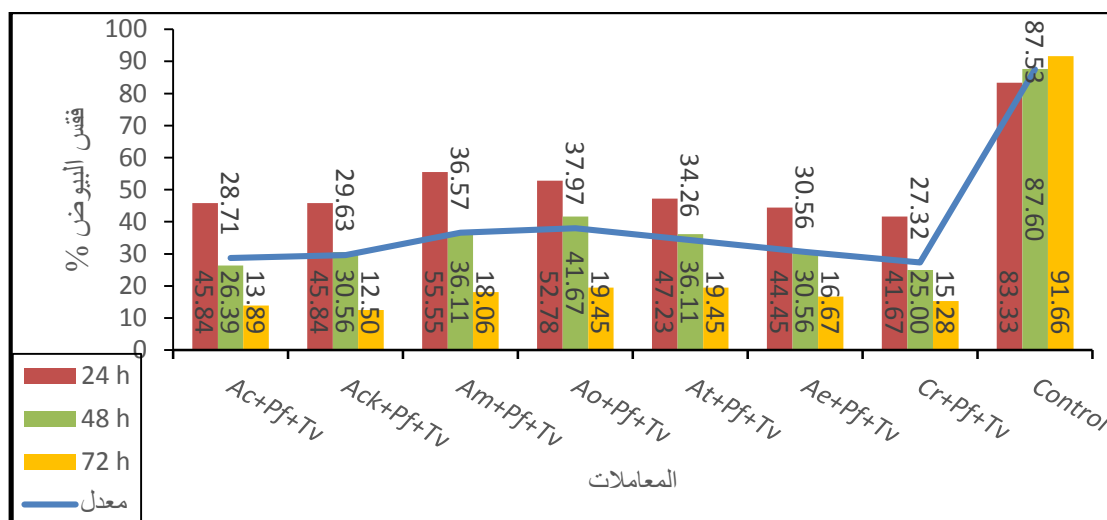
قيمة الـ LSD المؤثر = 3.975، قيمة الـ LSD للوقت = 2.434، معاملات التداخل = 6.886

شكل (3-56) تأثير مزيج من راشح الفطر *T.harzianum* وراشح البكتريا *P.fluorescens* مع رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود على موت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

### 16-3: تأثير مزيج من راشح الفطر *T.viride* وراشح البكتريا *P.fluorescens* مع رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود على فقس البيوض وموت يرقات الطور

#### الثاني لديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

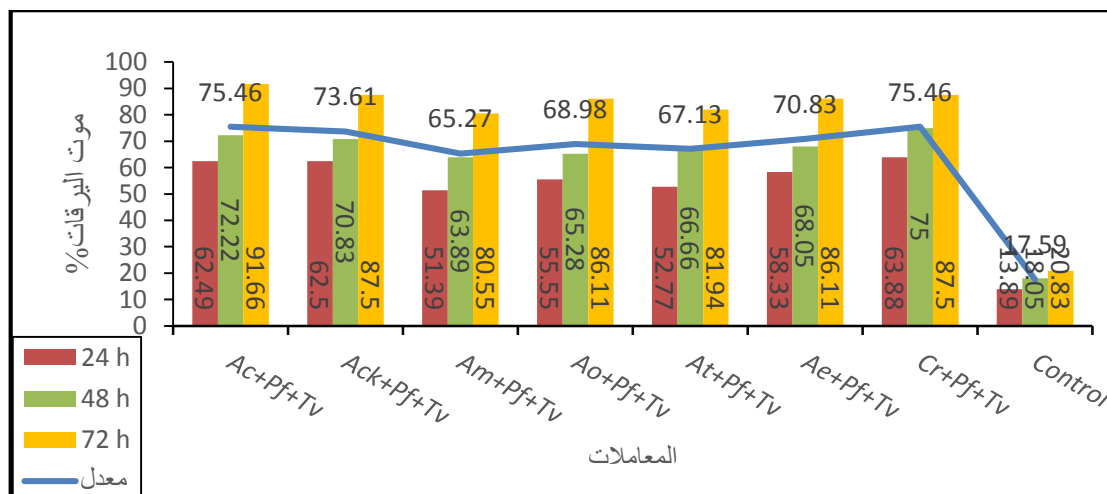
أوضحت نتائج الدراسة في شكل 3-57 ان اقل معدل لفقس بيوض النيما تود ظهرت في  $Cr+Pf+Tv$  وبلغت 27.32% والتي اختلفت معنويا عن معاملة السيطرة وتلاه  $At+Pf+Tv$  و  $Am+Pf+Tv$  34.26 و 36.57% لكل منهما على التوالي في حين اعلى تأثير  $Ao+Pf+Tv$  وبمعدل 37.97%. كان اقل معدل لفقس البيوض عند 72 ساعة وبلغ 25.87% واعلى معدل لفقس البيوض عند 24 ساعة وبلغ 52.09%.



قيمة ال-LSD المؤثر = 13.01 ، قيمة ال-LSD للوقت = 7.97 ، معاملات التداخل = 23.87

شكل (3-57) تأثير مزيج من راشح الفطر *T.viride* وراشح البكتريا *P.fluorescens* مع رواشح الفطريات الصائدة للنيما تود على فقس بيوض ديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

أوضحت نتائج الدراسة في شكل (3-58) ان اعلى معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود ظهرت في  $Cr+Pf+Tv$  و  $Ac+Pf+Tv$  وبلغت 75.46 و 75.46% والتي اختلفت معنويا عن معاملة السيطرة وتلاه  $Ack+Pf+Tv$  73.61% على التوالي في حين اقل تأثير  $Am+Pf+Tv$  وبمعدل 65.27%. كان اعلى معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود عند 72 ساعة والذي بلغ 77.77% واقل معدل لموت يرقات الطور الثاني للنيما تود عند 24 ساعة والذي بلغ 52.60%.



قيمة الـ LSD المؤثر = 3.664، قيمة الـ LSD للوقت = 2.244، معاملات التداخل = 6.346  
 شكل (3-58) تأثير مزيج من راشح الفطر *T.viride* وراشح البكتريا *P.fluorescens* مع رواسح الفطريات الصائفة للنيما تود على موت يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*

أظهرت نتائج الدراسة ان الفطريات الصائفة للنيما تود المختبرة لها القابلية على تثبيط فقس البيوض وموت يرقات الطور الثاني وهذا ما يتفق مع ما اشارت اليه دراسات عديدة حيث وجد ان الفطر *C.rosa* قادر على انتاج اعداد كبيرة من *Conidia* في وقت قصير جدا التي تلتصق بالنيما تود وتتكاثر في الجسم، وكذلك ينتج انزيمات Hydrolytic مثل *Proteases* و *Chitinase* و *Collagenase* التي تشارك في اختراق بشرة النيما تود وكذلك يؤثر على يرقات الطور الثاني (Hussain et al., 2017).

تعد الفطريات الصائفة للنيما تود والفطريات المتطفلة داخليا من عوامل المكافحة البيولوجية فهي تمتلك تكيفات رائعة في النقاط النيما تود بوسائل الاصطياد لأنها تعتبر النيما تود مصدر غذائي لها ومن الفطريات التي تمتلك احماض فعالة بيولوجيا *A.conoides* و *A.oligospora* و *D.brochopaga* ومن هذه الاحماض *Linoleic acid* و *Octadeca-9-12- dienoic acid* ووجد أيضا ان الفطر *D.brochopaga* ينتج مركب *Phomalactone* وكذلك *Bromomonocillin* و *Pochonin* ولهذه المركبات تأثير مثبط على يرقات الطور الثاني لنيما تود العقد الجذرية (Khan et al., 2001).

وأیضا وجد ان فطريات *Trichoderma* و *C.rosea* و *Arthrobotrys* يمكن ان تقتل يرقات الطور الثاني لـ *Meloidogyne sp.* وهي المسؤولة على الموت السريع لها لأنها مرتبطة مع الايض السام Toxic Metabolites الذي يفرز من هذه الفطريات ( Migunova et al., 2018).



لوحظ وجود نشاط مثبط كبير من قبل الفطرين *A.conoides* و *A.oligospora* ضد يرقات الطور الثاني لنيماتود العقد الجذرية (Nourani *et al.*, 2015). جاءت هذه الدراسة متفقة مع Sharon *et al.*, (2001) الذين ذكروا ان القدرة العالية للفطر *T.viride* في التطفل على بيوض ويرقات الطور الثاني لنيماتود العقد الجذرية يعود للفاعلية العالية لأنزيمي Chitinase و Protease الذي يفرزهما.

أكد Dababat *et al.*, (2006) ذلك حيث ذكروا ان الية التطفل المباشر على النيماتود ناتجة عن افرازات انزيمات مختلفة مثل Chitinase و Glucanase و Protease التي تحلل كاييتين قشرة بيوض النيماتود ويرقات الطور الثاني ودخول هايفات الفطر ليتغذى ويتكاثر داخلها، وفي دراسة أخرى اشار الوائلي واخرون (2011) الى القدرة العالية للبكتريا *P.fluorescens* في التأثير على فقس البيوض وموت يرقات الطور الثاني للنيماتود *Meloidogyne sp.* يعود الى قدرتها على انتاج الانزيمات والمضادات الحياتية (Mercado-Blanco *et al.*, 2007) التي كانت سببا لتثبيط اغلب مسببات امراض الجذور والنواتج الايضية المؤثرة (Siddiqui *et al.*, 2003) او يعود السبب الى افراز مادة Diacetylphloroglucinel التي تؤدي الى قتل يرقات النيماتود (Siddiqui *et al.*, 2004). حيث تنتج البكتريا *P.fluorescens* انزيم Extracellular protease الذي يؤثر في فقس البيض وموت يرقات الطور الثاني لنيماتود العقد الجذرية (Siddiqui *et al.*, 2005)، او يعود السبب لإنتاج البكتريا مادة Hydrocyanic acid (HCN) السامة التي تؤدي الى قتل اليرقات وهذا يتفق مع ما توصل اليه (Siddiqui *et al.*, 2006).

دراسات عديدة اشارت الى ان الفطر *T.viride* يؤدي دورا مهما في تثبيط نسبة فقس البيوض والتأثير في يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية وبالتالي تقل عدد العقد الجذرية على جذور النبات (Kumar *et al.*, 2006)، وانه يمتلك قدرة تثبيط عالية حيث له القدرة على التطفل وإنتاج المضادات الحياتية والتنافس على موقع الغذاء او على المغذيات (محسن واخرون، 2006) ويمتلك القدرة في انتاج انزيمات محلله للجدار الخلوي والتي تعمل ضمن اليات التطفل والتضاد مثل انزيم Protease و Chitinase و Cellulase (Hermosa *et al.*, 2000).

واكد حسن وهندي (2015) ان الفطر *T.harzianum* يمتلك القدرة العالية في انتاج انزيم الكايتينيز وبما ان الكايتين من المكونات الأساسية لجدار جسم النيماتود فيعمل الانزيم على تحليل الكايتين وبالتالي اضعاف الجدار الخلوي للنيماتود وهذه النتيجة تتوافق مع ما ذكره حسن واخرون (2011). ووجد ان *T.harzianum* و *T.viride* و *P.fluorescens* خفضت بشكل كبير العقد

الجدرية خصوصا على تثبيط فقس البيوض وقتل يرقات الطور الثاني فعند الخلط لاحظ انه يحصل على اكثر نسبة قتل واستفاد منها في المكافحة البيولوجية ( Ansari *et al.*, 2002; Siddiqui *et al.*, 2004).

وكذلك تؤثر الفطريات المنتجة للانزيمات المحلله على النيماتود عن طريق انتاج مركبات مضادة (Dong *et al.*, 2006)، وأكد تحليل (Scanning Electron Microscope (SEM) كشف تغيرات شديدة في البيوض عند تعرضه لراشح الفطرين *A. conoides* او *A. oligospora* فقد اظهر انتفاخ وانهيار الخلية بسبب تشققات في طبقات الكايتين ويلاحظ ان الانزيمات Hydrolytic enzyme المسؤولة عن تثبيط البيوض وموت يرقات الطور الثاني (Hajer *et al.*, 2010; Lopez-Llorca *et al.*, 2002).

وكذلك لاحظ (Tikhonov *et al.*, 2002) ان انزيم Chitinases و Protease يكون نشط خلال إصابة البيوض الذي يؤدي الى انهيار قشرة البيوض وكذلك ان الانزيمين Chitinases و Proteases يؤثران على سمك الكايتين الأساسي وهذا العمل يكون مشترك بين الكايتين والبروتيز وينتج عن ذلك تثبيط فقس البيوض وكذلك موت يرقات الطور الثاني لنيماتود العقد الجذرية.

الاستنتاجات:

1. ان تربة محافظة ميسان المدروسة غنية نوعا ما بأنواع الفطريات المهلكة للنيما تود حيث تم عزل وتشخيص واعطاء الوصف التصنيفي لعدة أنواع منها.
2. تم تشخيص الفطريات *Arthrotrrys cookedickison* و *A. microscaphoides* و *A. rutgeriense* و *Clonostachys rosea* لأول مرة في العراق.
3. ان استخدام الطرق الجزيئية بواسطة تقنية ال-PCR وعمل التتابعات Sequence ومقارنة النتائج مع العزلات المسجلة في بنك الجينات NCBI اعطت نتائج إيجابية في التشخيص لبعض هذه الفطريات ورسم الشجرة الوراثية لها.
4. أظهرت الدراسة وجود تضاد بين الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* وبين الفطريات الصائدة للنيما تود ولكن لا يوجد نوع من التطفل او التثبيط بينهما.
5. ان رواشح الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* والبكتريا *P.fluorescens* كان لهم اثر إيجابي في زيادة النمو الشعاعي واعداد الكونيدات للفطريات الصائدة للنيما تود المختبرة وهي نتيجة تسجل لأول مرة.
6. استعمال راشح الفطريات الصائدة للنيما تود المدروسة ورواشح الفطرين *T.harzianum* و *T.viride* وراشح البكتريا *P.fluorescens* أدى الى تثبيط فقس البيوض وزيادة موت يرقات الطور الثاني لنيما تود العقد الجذرية *Meloidogyne sp.*
7. وجد ان الفطريات الصائدة للنيما تود المختبرة لها القابلية على تكوين الاجسام النانوية.

التوصيات:

1. اجراء دراسة شاملة للفطريات الصائدة للنيما تود واختبار فعاليتها في السيطرة على النيما تود وتحديد الأنواع التي يمكن ان تكون مشاريع انتاج مبيدات حيوية.
2. دراسة إمكانية تصنيع مبيدات حيوية نيما تودية من الفطريات الصائدة للنيما تود والأكثر فعالية واستخدام تلك المركبات حيويًا
3. دراسة المركبات الحيوية المصنفة من الفطريات الصائدة للنيما تود ودراسة الحالة التوافقية بينها وبين المبيدات الحيوية الفطرية خصوصاً مركبات أنواع الفطر *Trichoderma*.
4. دراسة المواد الايضية التي تفرزها الفطريات الصائدة للنيما تود وتشخيص مركباتها وإمكانية استخدامها كمركبات سالكة في المقاومة الحيوية.
5. إمكانية الاستفادة من أنواع الفطريات الصائدة للنيما تود المدروسة والتي لها القدرة على انتاج الجسيمات الفضة النانوية واجراء دراسات حول استخدامها في المجال الطبي والصيدلاني كمضادات ميكروبية او سرطانية.
6. اجراء دراسات مقارنة بين عزلات مختلفة من الفطر *T.harzianum* وتحليل المركبات التي تنتجها العزلات واختبار قدراتها التضادية مع الفطريات الصائدة للنيما تود.

المصادر العربية:

- ابوغربية، وليد إبراهيم واحمد سعد الحازمي وزهير عزيز اسطيفان واحمد عبد السميع دوابه. 2010. نيماتودا النبات في البلدان العربية. الجزء الأول. دار وائل للنشر. ص586.
- الاسدي، علي زهير عبد. 2009، دراسة تأثير العوامل الحيوية والكيميائية والمستخلصات النباتية على العقد الجذرية في نبات الباميا المتسبب عن *Meloidogyne sp.* وإمكانية مكافحتها المتكاملة، رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة البصرة.
- أنطوان، باسمه جورج وزهير عزيز اسطيفان ومنى حمودي الجبوري. 2006. حساسية بعض أصناف التبغ للإصابة بنيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne sp.* والفطرين *Fusarium solani* و *Macrophomina phaseolina* ومكافحتها احيائياً وكيميائياً. مجلة الزراعة العراقية. 11: 68-80.
- البياتي، عادل عدنان علي. 2005 التحري عن الفطريات المفترسة للنيماتودا المتطفلة على النبات في بعض ترب المنطقة الجنوبية من العراق. رسالة ماجستير، كلية الزراعة. جامعة بغداد.
- ثابت، كمال علي ورجب محمود طاهر وعبدالله الحمد الشهيري ومصطفى محمد فهميم. 1976. علم امراض النبات. جامعة القاهرة. كلية الزراعة. مطبعة السعادة. ص639.
- حاجم، احمد كاظم. 2014. انتاج جسيمات الفضة النانوية باستخدام بعض فطريات التربة وتقييم نشاطها الضد مايكروبي مختبرياً. رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة البصرة.
- حسن، احمد عبد المنعم. 2001. القرعيات. الامراض والافات ومكافحتها. دار العدنان للطباعة. 330.
- حسن، عبدالله عبدالكريم وعبد الكريم عريبي الكطراني واقتخار موسى جبارة وخلدون فارس سعيد (2011). تقييم فعالية الفطر الغذائي *Pleurotus sp* كمبيد حيوي ضد ممرضات النبات: الديدان الشعبانية وفطريات التربة. وقائع المؤتمر العلمي الزراعي الخامس – كلية الزراعة – جامعة تكريت. 26-27 نيسان. 431-447.
- حسن، عبدالله عبدالكريم وهندي، ياسر خلف (2015). المقاومة المتكاملة لنيماتودا *Anguina tritici* باستعمال بعض المبيدات الكيميائية والفطر *Trichoderma harzianum* المعزولة من حقول الحنطة في محافظة صلاح الدين. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية 15(4). 14.
- الراوي، خاشع محمود خلف الله، عبد العزيز محمد. 1980. تصميم وتحليل التجارب الزراعية، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل، ص 350.
- الساعدي، احمد مشاري ذاري. 2011. إمكانية تصنيع مستحضر احيائي من الفطر *Trichoderma viride* وتطبيقه في مكافحة الاحيائية لمرض ذبول وتعقد جذور البطيخ المتسبب عن الفطر *Fusarium oxysporum f.sp.melonis* والنيماتود *Meloidogyne sp.* رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة البصرة
- عبدالرضا، امل صالح وكاظم جاسم حمادي وميثم أيوب الحمداني (2010). تقييم كفاءة بعض عزلات جراثيم *Pseudomonas fluorescens* في حماية نبات الطماطة من الإصابة بالفطر *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* مع دراسة نسيجية لجذر العائل. مجلة أبحاث البصرة العلمية. 36 (6). 59-81.

- عبدالله، زينب خلف. 2015. دراسة تصنيفية وحياتية للفطريات الناقصة الملونة في البصرة. أطروحة دكتوراه، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة البصرة.
- علي، احمد محمد. 1988. عالم الفطريات، الطبعة الأولى، الدار الوطنية للنشر والتوزيع، القاهرة.
- قاسم، علي عبدالواحد. 1997. دراسة حول الفطريات المهلكة للنيماتود في تربة جنوب العراق. رسالة ماجستير، جامعة البصرة، 101.
- قاسم، علي عبدالواحد. 2006. دراسة تصنيفية وحياتية للفطريات المهلكة للديدان الثعبانية (Nematophagous fungi) في وسط وجنوب العراق وإمكانية استخدامها في السيطرة الحيوية. أطروحة دكتوراه. جامعة البصرة. كلية التربية.
- قاسم، علي عبدالواحد و توفيق محمد محسن، كاظم جاسم حمادي. 2009a. دراسة الفعالية الأنزيمية الخارج خلوية (Exocellular Enzymes) للفطريات الصائفة للنيماتود -Nematodes-Trapping Fungi على الأوساط الزراعية الصلبة. المؤتمر الثاني للعلوم الصرفة والتطبيقية / جامعة الكوفة. مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة. (عدد خاص) 108-101.
- قاسم، علي عبدالواحد وكاظم جاسم حمادي، توفيق محمد محسن. 2009b. دراسة التأثير التحفيزي لبعض المواد في تكوين أدوات الاصطياد في الفطريات الصائفة للنيماتود. المؤتمر العلمي الثاني / جامعة واسط المؤتمر العلمي الثاني. مجلة جامعة واسط (عدد خاص). 755-744.
- محسن، رشيد و عبدالعزيز تكسانة و مبارك بقة (2006). مكافحة الحيوية لمسبب مرض البيوض باستخدام فطري *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma viride*. المؤتمر العربي التاسع لعلوم وقاية النبات. ص 216.
- مولان، يونس يوسف وعلاء صلاح الدين كامل وصلاح الدين الحسيني محمد. 2005. مكافحة الطبيعية الكيميائية والبيولوجية للمسببات المرضية لذبول وموت بادرات بعض محاصيل الخضر في البيوت المحمية في منطقة الرياض. المملكة العربية السعودية مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية الإدارة العامة لبرامج المنح. م ص 8-50.
- ميخائيل، سمير وعبد الحميد طرابية وعبدالجواد الزرري. 1981. امراض البساتين والخضر. مطبعة جامعة الموصل. ص 281.
- الوائل، ضياء سالم علي و طه ياسين مهودر و علي زهير عبد الاسدي. 2011. مكافحة المتكاملة لمرض العقد الجذرية في نبات الباميا المتسبب عن *Meloidogyne sp.* (Treub) Chitwood. مجلة أبحاث البصرة (العلميات). 37(4). 43-31.

### المصادر الاجنبية:

- Agrios, G.N. 1997. *Plant Pathology*. Academic Press. 4 ed. New York: USA.
- Al-Hazmi, A. S., and M. Tariqjaveed. 2016. "Effects of Different Inoculum Densities of *Trichoderma Harzianum* and *Trichoderma Viride* against *Meloidogyne Javanica* on Tomato." *Saudi Journal Of Biological Sciences* 23 (2): 288–92. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.007>.
- Al-Whaibi, M. H. 2006. "Role of Diazotrophic Bacteria in Some Non – leguminous Plant." *Journal of Saudi Society for Agricultural Sciences*

- 5 (2).
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2008. *Molecular Biology of the Cell*. Edited by Garland Science. 5th ed. New York: Garlandv.
- Alexopoulos, CJ, CW Mims, and M Blackwell. 1996. *Introductory Mycology*. Edited by New York Wiley. 4th edn. Wiley, New York.
- Ansari, Minshad A, Bionema Limited, and Ahmed Douaik. 2002. "Effect of Culture Filtrates of *Pseudomonas Striata*, *Trichoderma Harzianum*, *T. Viride* and *Aspergillus Awamori* on Egg Hatch of *Meloidogyne Javanica*." *International Journal of Nematology* 12: 131–136.
- Barron, G. L. 1977. *The Nematode-Destroying Fungi*. Canada: Canadian Biological Publications Ltd.
- Barron, G. L. 2003. "Predatory Fungi, Wood Decay, and the Carbon Cycle." *Biodiversity*, 4 (1): 3–9.
- Bell, D. K., H. D. Wells, and C. R. Markham. 1982. "In Vitro Antagonism of *Trichoderma* Species against Six Fungal Plant Pathogens." *Phytopathology* 72 (4): 379–382.
- Bills, GF, G Platas, F Pelaez, and P Masurekar. 1999. "Reclassification of Pneumocandin-Producing Anamorph, *Glarea Lozoyensis* Gen. et. Sp. Nov., Previously Identified as *Zalerion Arboricola*." *Mycological Research* 103: 179–192.
- Bjorkman, T., L. M. Blanchar, and G. E. Harman. 1998. "Growth Enhancement of Shrunken -2 Sweet Corn by *Trichoderma Harzianum* 1295-22:Effect of Enviromental Stress ." *Amer. Society for Horticul. Sc.* 123 (1): 40–42.
- Bordallo, J. J., L. V. Lopez-Llorca, H.-B. Jansson, J. Salinas, L. Persmark, and L.Asensio. 2002. "Colonization of Plant Roots by Egg-Parasitic and Nematode-Trapping New Fungi." *New Phytologist* 154 (2): 491–99.
- Bouwman, L.A., J. Bloem, P.H.J.F. van den Boogert, F. Bremer, and G.H.J. Hoenderboom. 1994. "Short-Term and Long-Term Effects of Bacterivorous Nematodes and Nematophagous Fungi on Carbon and Nitrogen Mineralization in Microcosms." *Biol Fertil Soils* 17: 249–56.
- Braga, F.R., and J.V. Araújo. 2014. "Nematophagous Fungi for Biological Control of Gastrointestinal Nematodes in Domestic Animals." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 71–82.
- Bretagne, Stéphane, and Jean Marc Costa. 2006. "Towards a Nucleic Acid-Based Diagnosis in Clinical Parasitology and Mycology." *Clinica Chimica Acta* 363 (1–2): 221–228.
- Brotman, Yariv, J. Gupta Kapugant, and Ada Viterbo. 2010. "Quick Guide *Trichoderma*." *Current Biology Vol* 20 (9): 390–391.
- Burch, G, and S U Sarathchandra. 2002. "Hydrolytic Enzyme Activities in

- Trichoderma SPP.” *New Zealand Plant Protection* 55: 440.
- Callaghan, Felicity E O, Roberto A Braga, Roy Neilson, Stuart A Macfarlane, and Lionel X Dupuy. 2018. “New Live Screening of Plant- Nematode Interactions in the Rhizosphere.” *Nature* 8: 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18797-7>.
- Campos, Artur Kanadani, Marisa Caixeta Valadão, Lorendane Millena de Carvalho, Jackson Victor de Araújo, and Marcos Pezzi Guimarães. 2017. “In Vitro Nematophagous Activity of Predatory Fungi on Infective Larvae of Strongyloides Papillosus.” *Acta Veterinaria Brasilica* 11 (4): 213–218.
- Chandrawathani, P, O Jamnah, M Adnan, PJ Waller, M Larsen, and AT Gillespie. 2004. “Field Studies on the Biological Control of Nematode Parasites of Sheep in the Tropics, Using the Microfungus Duddingtonia Flagrans.” *Vet Parasitol* 120: 177–187.
- Chandrawathani, P, J Omar, JW Peter, H Johan, M Larsen, and MZ Wan. 2002. “Nematophagous Fungi as a Biological Control Agent for Nematode Parasites of Small Ruminants in Malaysia: A Special Emphasis on Duddingtonia Flagrans.” *A Journal on Animal Infection* 33: 685–696.
- Chartier, C, and I Pors. 2003. “Effect of the Nematophagous Fungus, Duddingtonia Flagrans, on the Larval Development of Goat Parasitic Nematodes: A Plot Study.” *Vet Res.* 34 (2): 221–230.
- Chet, I. Y., and I. N. Benhamou. 1992. “Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis Sativus* L.) by Biocontrol Agent *Trichoderma Harzianum*.” *Appl. Environ. Microbiol* 65: 1061–1070.
- Colagiero, Mariantonietta, Laura C. Rosso, and Aurelio Ciancio. 2018. “Diversity and Biocontrol Potential of Bacterial Consortia Associated to Root-Knot Nematodes.” *Biological Control* 120: 11–16.
- Cooke, R.C., and Pramer. 1968. “*Monacrosporium Rutgeriense* Sp. n., Nematode-Trapping Hyphomycete.” *Phytopathology* 58: 544–545.
- Costa Silva, L. P., J. P. Oliveira, W. J. Keijok, A. R. da Silva, A. R. Aguiar, M. Guimarães, C. M. Ferraz, J. V. Araújo, F. L. Tobias, and F. R. Braga. 2017. “Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using the Cell-Free Filtrate of Nematophagous Fungus *Duddingtonia Flagrans*.” *International Journal of Nanomedicine* 12: 6373–6381.
- Cruz, D G, C P Silva, C N B Carneiro, C A Retamal, J T L Thiébaud, R A Damatta, and C P Santos. 2009. “Acid Phosphatase Activity during the Interaction of the Nematophagous Fungus *Duddingtonia Flagrans* with the Nematode *Panagrellus* Sp.” *Journal of Invertebrate Pathology* 102 (3): 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.08.003>.
- Dababat, A.A., RA Sikora, and R. Hauschild. 2006. “Use of *Trichoderma Harzianum* and *Trichoderma Viride* for the Biological Control of



- Meloidogyne Incognita on Tomato.” *Commun Agric Appl Biol Sci.* 71 (3): 953–961.
- Dackman, C., H. B. Jansson, and B. Nordbring-Hertz. 1992. “Nematophagous Fungi and Their Activities in Soil. In G. Stotsky & J-M. Bollag (Eds.),” *Soil Biochemistry* 7: 95–130.
- Dackman, C, H. B. Jansson, and H. B. Nordbring. 1992. *Nematophagous Fungi and Their Activities in Soil.* 7th ed. New York: Marcel Dekker.
- Dong, L. Q., and K. Q. Zhang. 2006. “Microbial Control of Plant-Parasitic Nematodes: A Five-Party Interaction.” *Plant Soil* 288: 31–45. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9009-3>.
- Druzhinina, I.S., V. Seidl-Seiboth, A. Herrera-Estrella, B.A. Horwitz, C.M. Kenerley, E. Monte, P.K. Mukherjee, S. Zeilinger, I.V. Grigoriev, and C.P. Kubicek. 2011. “Trichoderma: The Genomics of Opportunistic Success.” *Nature Reviews Microbiology* 9: 749–759.
- Dunbabin, V. M., J. A. Postma, A. Schnepf, L. Pagès, M. Javaux, L. Wu, D. Leitner, Y. L. Chen, Z. Rengel, and A. J. Diggle. 2013. “Modelling Root-Soil Interactions Using Three-Dimensional Models of Root Growth, Architecture and Function.” *Plant and Soil* 372 (1/2): 93–124.
- Fayaz, A Mohammed, K Balaji, P T Kalaichelvan, and R Venkatesan. 2009. “Fungal Based Synthesis of Silver Nanoparticles — An Effect of Temperature on the Size of Particles.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74: 123–126.
- Fayaz, MA, K Balaji, M Girilal, PT Kalaichelvan, and R Venkatesan. 2009. “Mycobased Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Incorporation into Sodium Alginate Films for Vegetable and Fruit Preservation.” *J Agric Food Chem* 57 (14): 6246–6252.
- Gade, A K, P Bonde, A P Ingle, P D Marcato, N Durán, and M K Rai. 2008. “Exploitation of *Aspergillus Niger* for Synthesis of Silver Nanoparticles” 2 (3): 243–47. <https://doi.org/10.1166/jbmb.2008.401>.
- Glockling, S., and M. Dick. 1994. “*Dactylella Megalobrocha*, a New Species of Nematophagous Fungus with Constricting Ring.” *Mycological Research* 98: 845–853.
- Gomes, AP, JV Araújo, and RC Ribeiro. 1999. “Differential in Vitro Pathogenicity of Predatory Fungi of the Genus *Monacrosporium* for Phytonematodes, Free-Living Nematodes and Parasitic Nematodes of Cattle.” *Braz J Med Biol Res.* 32 (1): 79–83.
- Gomes, NCM, H Heuer, J Schönfeld, R Costa, L Mendonca-Hagler, and K Smalla. 2001. “Bacterial Diversity of the Rhizosphere of Maize (*Zea Mays*) Grown in Tropical Soil Studied by Temperature Gradient Gel Electrophoresis.” *Plant Soil* 232: 167–180.
- Goswami, B.K., C. Bhattacharya, R. Paul, and T.A. Khan. 2012. “Performance of Pesticide and Biopesticide on Growth, Yield and

- Forskolin Content in *Coleus Forskohlii* Infected with *Meloidogyne Incognita*.” *Pakistan Journal of Nematology* 30 (1): 49–56.
- Gouveia, S. A., F. E. F. Soares, T. Morgan, B. L. Sufiate, G. P. Tavares, and F. R. Braga. 2017. “Enhanced Production of *Monacrosporium Thaumasio* 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>.
- Grondona, I, R Hermosa, M Tejada, M D Gomis, P F Mateos, P D Bridge, and E Monte. 1997. “Physiological and Biochemical Characterization of *Trichoderma Harzianum* , a Biological Control Agent against Soilborne Fungal Plant Pathogens.” *Applied and Environmental Microbiology* 63 (8): 3189–3198.
- Hajer, R., C. Aurelio, H. R. Najet, G. Gaetano, and R. Laura. 2010. “Effects of Culture Filtrates from the Nematophagous Fungus *Verticillium Leptobactrum* on Viability of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne Incognita*.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26 (12): 2285–2289.
- Hallmann, J., K. G. Davies, and R. A. Sikora. 2009. “Biological Control Using Microbial Pathogens, Endophytes and Antagonists.” In *Root-Knot Nematodes*, edited by R. N. Perry, M. Moens, and J. L. Starr. Wallingford: CABI.
- Harman, G. 2006. “Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* Spp.” *Phytopathology* 96: 190–194.
- 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.
- Hasan, H. A. H. 1998. “Studies on Toxigenic Fungi in Roasted Foodstuff (Salted Seed) and Halotolerant Activity of Emodinproducing *Aspergillus Wentii*.” *Folia Microbiol* 43: 383–391.
- Hassan, Abdullah Abdu Kareem, and Yaser Khalaf Hindi. 2015. “Integrated Control of *Anguina Tritici* by Some Nematodacides and *Trichoderma Harzianum* Isolated From Wheat Fields in Salah Aldin Governorate.” *Journal of Tikrit University For Agriculture Sciences* 15 (4): 85–98.
- Hay, F. S., J. H. Niezen, D. Leathwick, and R. A. Skipp. 2002. “Nematophagous Fungi in Pasture: Colonisation of Sheep Faeces and Their Potential for Control of Free-Living Stages of Gastro-Intestinal Nematode Parasites of Sheep.” *Animal Production Science* 42: 7–13.
- Hay, FS, and L Bateson. 1997. “Effect of the Nematophagous Fungi *Hirsutella Rhossiliensis* and *Verticillium Balanoides* on Stem Nematode (*Ditylenchus Dipsaci*) in White Clover.” *Aust Plant Pathol* 26: 142–147.

- Hermosa, M R, I Grondona, and E A Iturriaga. 2000. "Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* Spp ." *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 66 (5): 1890–1898.
- Hermosa, R., R.E. Cardoza, M.B. Rubio, S. Guti?errez, and E. Monte. 2014. "Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of *Trichoderma* A2-Gupta, Vijai K. I." In *Biotech- Nology and Biology of Trichoderma.*, edited by M.S. Herrera- Estrella, R.S.U. Druzhinina, and M.G. Tuohy, 125–37. Amsterdam: Elsevier.
- 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, 247–267. Switzerland: Springer International.
- Hussain, M., M. Zouhar, and Ryšánek. 2017. "Effects of Nematophagous Fungi on Viability of Eggs and Juveniles of *Meloidogyne Incognita*." *The Journal of Animal & Plant Sciences* 27 (1): 252–258.
- Hussey, RS, and KR Barker. 1973. "A Comparison of Methods of Collecting Inocula for *Meloidogyne* sp., Including a New Technique." *Plant Dis* 57: 1025–1028.
- Intana, W., and C. Chamswarnng. 2007. "Control of Chinese-Kale Damping-off Caused by *Pythium Aphanidermatum* by Antifungal Metabolites of *Trichoderma Virens*." *J. Sci. Technol.* 29 (4): 919–927.
- Jansson, H. B. 1982. "Predacity by Nematophagous Fungi and Its Relation to the Attraction of Nematodes." *Microbial Ecology* 8: 233–40.
- Jansson, H. B., and R. Odeslius. 2000. "Growth and Capture Activities Low Temperature Scanning Electron Microscopy." *Mycologia* 92 (1): 10–15.
- Jansson, H. B., and J. G. O. Poinar. 1986. "Some Possible Fossil Nematophagous Fungi." *Trans. Br. Mycol. Soc.* 87: 471–474.
- Jansson, H.B., and B.A. Jaffee. 1990. *Nematophagous Fungi: Recover from Soil* . In *Plant Nematology*. Edited by L.R. Zuckerman , B.M. and Krusberg. USA: Uni . Of Massachusetts.
- Jansson, H.B., and V. Lopez-Iloxcál. 2004. "Control of Nematodes by Fungi. In." *Fungal Biotechnology in Agriculture, Food and Environmental Applications*, 205–215.
- Jansson, HB, and LV Lopez-Llorca. 2001. *Biology of Nematophagous Fungi. In: JK Misra, Horn BW (Eds) Mycology: Trichomycetes, Other Fungal Groups and Mushrooms*. Enfield, CT, USA.
- Jansson, HB, and LV Lopez. 2004. *Control of Nematodes by Fungi. In: Arora DK (Ed) Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*. New York: Dekker, New York.
- Jeewon, R., and KD. Hyde. 2007. "Detection and Diversity of Fungi from

- Environmental Samples: Traditional versus Molecular Approaches. Soil Biology.” In *In Advanced Techniques in Soil Microbiology*, edited by R Oelmuller A Varma, 1–15. Berlin: Springer.
- Juan, L., Y. Jinkui, L. Lianming, and Z. Ke-Qin. 2008. “Taxonomic Revision of the Nematode-Trapping Fungi *Arthrobotrys Multisecundaria*.” *The Journal of Microbiology* 46 (5): 513–518. <https://doi.org/10.1007/s12275-007-0115-6>.
- 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.
- Kannan, N, and S Subbalaxmi. 2011. “A Current Perspective.” *Rev. Adv. Mater. Sci.* 27 27: 99–114.
- Karbasian, M, S M Atyabi, SD Siadat, SB Momen, and D Norouzian. 2008. “Optimizing Nano-Silver Formation by *Fusarium Oxysporum* PTCC 5115 Employing Response Surface Methodology.” *American Journal of Agricultural and Biological Science* 3 (1): 433–437.
- Kashyap, PL, S Kumar, AK Srivastava, and AK Sharma. 2013. “Myconanotechnology in Agriculture: A Perspective. World.” *J Microbiol Biotechnol* 29 (2): 191–207.
- Khan, A. M., and S. Bhadauria. 2018. “Molecular Characterization of Keratin Degrading Fungi Isolated from Semi-Arid Soil by PCR Using ITS4 and ITS5 Primers.” *Journal of King Saud University - Science*, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.04.014>.
- Khan, H. U., R. Ahmad, W. Ahmed, S M Khan, and M A. Khan. 2001. “Evaluation of the Combined Effects of *Paecilomyces Lilacinus* and *Trichoderma Harzianum* Against Root-Knot Disease of Tomato.” *Journal of Biological Sciences* 1 (3): 139–142.
- Khan, T. A., M. S. Ashraf, and R. A. Dar. 2010. “Pathogenicity and Life Cycle of *Meloidogyne Javanica* on Broccoli.” *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 43 (6): 602–608.
- Kumar, G. B., P. R. Kumar, and R. K. Singh. 2006. “Integrated Application of Some Compatible Biocontrol Agents along with Mustard Oil Seed Cake and Furadan on *Meloidogyne Incognita* Infecting Tomato Plants.” *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 7 (11): 873–75.
- Kwok, O C H, R Plattner, D Weisleder, and DT Wicklow. 1992. “A Nematicidal Toxin from *Pleurotus Ostreatus* NRRL 3526.” *J Chem Ecol* 18: 127–136.
- Lambert, K., and S Bekal. 2002. “Introduction to Plant-Parasitic Nematodes.” *The Plant Health Instructor*. Urbana: University of Illinois. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2002-1218-01>.
- Li, Juan, KD Hyde, and Ke-Qin Zhang. 2014. “Methodology for Studying Nematophagous Fungi.” In *Nematode-Trapping Fungi*, edited by K.

- Q. Zhang and K. D. Hyde, 13–40. New York: Springer.
- Linford, M. B., F. Yap, and J. M. Oliveira. 1938. “Reduction of Soil Populations of the Root-Knot Nematode during Decomposition of Organic Matter.” *Soil Sci.* 45: 127–141.
- Lopez-Llorca, L. V., H. B. Jansson, J. G. M. Vicente, and J. Salinas. 2006. “Nematophagous Fungi as Root Endophytes.” *Soil Biology* 9: 191–206.
- Lopez-Llorca, LV, C Olivares-Bernabeu, J Salinas, HB Jansson, and PE Kolattukudy. 2002. “Prepenetration Events in Fungal Parasitism of Nematode Eggs.” *Mycol Res* 106: 499–506.
- Luns, F. D., R. Carolina, L. Assis, L. Pinheiro, C. Silva, C. M. Ferraz, F. R. Braga, and J. V. Araújo. 2018. “Coadministration of Nematophagous Fungi for Biological Control over Nematodes in Bovine in the South-Eastern Brazil.” *BioMed Research International*: 1–6.
- Madhi, Q. H. 2013. “Evaluation of Salicylic Acid and Some Bio Agent Factors Efficiency in Control of Okra Root Rot Disease Caused By *Rhizoctonia Solanikuhn*.” basrah univercity.
- Maicas, S, A C Adam, and J Polaina. 2000. “The Ribosomal DNA of the Zygomycete *Mucor Miehei*.” *Curr. Genet.* 37 (6): 412–419.
- Mankau, R. 1980. “Biological Control Of Nematode Pests By Natural Enemies.” *Ann. Rev. Phytopathol* 18: 415–440.
- Martínez-Castañón, G. A., N. Niño-Martínez, F. Martínez-Gutierrez, J. R. Martínez-Mendoza, and Facundo Ruiz. 2008. “Synthesis and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles with Different Sizes.” *J Nanopart Res* 10: 1343–1348.
- Mercado-Blanco, J., and P.A. Bakker. 2007. “Interactions between Plants and Beneficial *Pseudomonas* Spp.: Exploiting Bacterial Traits Crop Protection.” *Antonie Leeuwenhoek* 92: 367–389.
- Meyer, Susan I. F., and Lynn K. Carta. 2005. “Morphological Variability and Molecular Phylogeny of the Nematophagous Fungus *Monacrosporium Drechsleri* Morphological Variability and Molecular Phylogeny of the Nematophagous Fungus *Monacrosporium Drechsleri*.” *Mycologia* 97 (2): 405–415.
- Migunova, V., N. Sasanelli, I. National, and A. Kurakov. 2018. “Effect of Microscopic Fungi on Larval Mortality of the Root-Knot Nematodes *Meloidogyne Incognita* and *Meloidogyne Javanica*.” *Biological and Integrated Control of Plant Pathogens* 133: 27–31.
- Mitkowski, N. A., and G. S. Abawi. 2003. “Root-Knot Nematode.” *The Plant Health Instructor*. University of Rhode Island.
- Moharrer, S., M. Behroz, A. G. Reza, and Y. Mehdi. 2012. “Biological Synthesis of Silver Nanoparticles by *Aspergillus Flavus*, Isolated from

- Soil of Ahar Copper Mine.” *Indian Journal of Science and Technology* 5 (3): 2443–2444.
- Moosavi, M.R., and T.H. Askary. 2015. “Nematophagous Fungi: Commercialization.” In *Biocontrol Agents of Phytonematodes*, edited by T.H. Askary and P.R.P. Martinelli, 187–202.
- Muhammed S., and N. A. Amusa. 2003. “In-Vitro Inhibition of Growth of Some Seedling Blight Inducing Pathogens by Compost-Inhabiting Microbes.” *Biotechnology* 2 (6): 161–164.
- Muhasin, T. M. 1990. “Effect of Salts on the Growth of Fungi Associated with Halophytes in Vitro.” *Basrah J. of Agric. Sci.* 3 (2): 151–59.
- Mukherjee, P. K., B. A. Horwitz, A. Herrera-estrella, M. Schmoll, and C. M. Kenerley. 2013. “Trichoderma Research in the Genome Era.” *Annu. Rev. Phytopathol* 51: 105–29. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>.
- Nagachandrabose, S. 2018. “Liquid Bioformulations for the Management of Root-Knot Nematode, Meloidogyne Hapla That Infects Carrot.” *Crop Protection* 114: 155–161.
- Naher, L., U. K. Yusuf, A. Ismail, and K. Hossain. 2014. “Trichoderma Spp.: A Biocontrol Agent for Sustainable Management of Plant Diseases.” *Pakistan Journal of Botany* 46 (4): 1489–1493.
- Nayak, B K, N Chitra, and A. Nanda. 2015. “Blend of Tetracycline and AgNPs Synthesized from Alternaria Have Potentiality as Antibacterial Drug.” *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 7 (2): 534–539.
- Nayak, B K, N Chitra, and Anima Nanda. 2014. “Efficacy of Biosynthesized AgNPs from Alternaria Chlamydospora Isolated from Indoor Air of Vegetable Market” 6 (4): 1309–1314.
- Niu, X. M., Y. L. Wang, Y. S. Chu, H. X. Xue, N. Li, L. X. Wei, M. H. Mo, and K. Q. Zhang. 2010. “Nematodetoxic Aurovertin-Type Metabolites from a Root-Knot Nematode Parasitic Fungus Pochonia Chlamydosporia.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2): 828–834. <https://doi.org/10.1021/jf903259n>.
- Nordbring-Hertz, B., H. B. Jansson, and A. Tunlid. 2006. “Nematophagous Fungi.” *John Wiley & Sons*, 1–11.
- Nourani, S. L., E. M. Goltapeh, N. Safaie, and M. J. Javaran. 2015. “The Effects of Arthrobotrys Oligospora and Arthrobotrys Conoides Culture Filtrates on Second Stage Juvenile Mortality and Egg Hatching of Meloidogyne Incognita and Meloidogyne Javanica.” *J. Crop Prot.* 4: 667–674.
- Ooij, Van. 2011. “Fungal Pathogenesis: Hungry Fungus Eats Nematode.” *Nat Rev Microbiol* 9: 766–767.
- Pozo, M.J., J.M. Baek, J.M. Garcia, and C.M. Kenerley. 2004. “Functional

- Analysis of Tvsp1, a Serine Protease-Encoding Gene in the Biocontrol Agent *Trichoderma Virens*.” *Fungal Genetics and Biology* 41: 336–348.
- Rai, M, A Yadav, P Bridge, and A. Gade. 2009. Myconanotechnology: A New and Emerging Science, in *Applied Mycology*, Ed by Rai MK and Bridge PD. New York: CAB, New York.
- Reino, J. L., R. F. Guerrero, Hernandez G. R., and I. G. Collado. 2008. “Secondary Metabolites from Species of the Biocontrol Agent *Trichoderma*.” *Phytochem Rev* 7: 89–123.
- Roco, A., and L. M. Pérez. 2001. “In Vitro Biocontrol Activity of *Trichoderma Harzianum* on *Alternaria Alternata* in the Presence of Growth Regulators.” *Electronic Journal of Biotechnology* 4 (2): 32–37. <https://doi.org/10.2225/vol4-issue2-fulltext-1>.
- Sadowski, Z., I. H. Maliszewska, B. Grochowalska, I. Polowczyk, and T. Koźlecki. 2008. “Synthesis of Silver Nanoparticles Using Microorganisms.” *Materials Science- Poland* 26 (2): 419–424.
- Sarkar, J, P Dey, S Saha, and K Acharya. 2011. “Mycosynthesis of Selenium Nanoparticles.” *IET Micro Nano Lett* 6 (8): 599–602.
- Saxena, J., M. M. Sharma, S. Gupta, and A. Singh. 2014. “Emerging Role Of Fungi In Nanoparticle Synthesis And Their Applications.” *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* 3 (9): 1586–1613.
- Scholler, M, M. Hagedorn & A. RubnerScholler, G. Hagedorn, and A. Rubner. 1999. “A Reevaluation of Predatory Orbiliaceous Fungi. II. A New Generic Concept.” *Sydowia* 51 (1): 89–113.
- Schroers, H., G. J Samuels, K. A Seifert, W. Gams, J Samuels, and K. A Seifert. 1999. “Classification of the Mycoparasite *Gliocladium Roseum* in *Clonostachys* as *C. Rosea*, Its Relationship to *Bionectria Ochroleuca*, and Notes on Other Fungi.” *Mycologia* 91 (2): 365–85.
- Segers, R., T. M. Butt, J. H. Carder, J. N. Kee, B. R. Kerry, and J. F. Peberdy. 1999. “The Subtilisins of Fungal Pathogens of Insects, Nematodes and Plants: Distribution and Variation.” *Mycological Research* 103: 395–402.
- Selbmann, L., G.S. de Hoog, A. Mazzaglia, E.I. Friedmann, and S. Onofri. 2005. “Fungi at the Edge of Life: Cryptoendolithic Black Fungi from Antarctic Deserts.” *Studies in Mycology* 51: 1–32.
- Sharma, P., and R. Pandey. 2009. “Biological Control of Root-Knot Nematode ; *Meloidogyne Incognita* in the Medicinal Plant ; *Withania Somnifera* and the Effect of Biocontrol Agents on Plant Growth.” *African Journal of Agricultural Research Vol.* 4 (6): 564–567.
- Sharon, E, I Chet, O Kleifeld, and Y Spiegel. 2001. “Biological Control of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne Javanica* by *Trichoderma*

- Harzianum” 91 (7): 687–693.
- Siddiqui, I. A., Amer Z., M. J. Zaki, and S. S. Shaukat. 2001. “Use of Trichoderma Species in the Control of Meloidogyne Javanica Root Knot Nematode in Okra and Mungbean.” *Pakistan Journal of Biological Sciences* 4 (7): 846–848.
- Siddiqui, I. A., and S. S. Shaukat. 2003. “Suppression of Root-Knot Disease by Pseudomonas Fluorescens CHA0 in Tomato: Importance of Bacterial Secondary Metabolite, 2,4-Diacetylphloroglucinol.” *Soil Bi- Ology and Biochemistry* 35: 1615–1623.
- Siddiqui, I. A., S S. Shaukat, I. H. Sheikh, and A. Khan. 2006. “Role of Cyanide Production by Pseudomonas Fluorescens CHA0 in the Suppression of Root-Knot Nematode , Meloidogyne Javanica in Tomato.” *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22: 641–650. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9084-2>.
- Siddiqui, I.A., S.S. Shaukat, M.J. Zaki, and N.I. Ali. 2002. “Nematicidal Activity of Some Strains of Pseudomonas Spp.” *Soil Biol. Biochem.* 34: 1051–1058.
- Siddiqui, I A, and S S Shaukat. 2004. “Trichoderma Harzianum Enhances the Production of Nematicidal Compounds in Vitro and Improves Biocontrol of Meloidogyne Javanica by Pseudomonas Fluorescens in Tomato.” *Letters in Applied Microbiology* 38: 169–175.
- Siddiqui, IA, D Haas, and S. Heeb. 2005. “Extracellular Protease of Pseudomonas Fluorescens CHA0, a Biocontrol Factor with Activity against the Root-Knot Nematode Meloidogyne Incognita.” *Appl Environ Microbiol.* 71: 5646–5649.
- Silambarasan, S., and J. Abraham. 2013. “Biosynthesis of Silver Nanoparticles.” *African Journal of Biotechnology* 12 (21): 3088–3098. <https://doi.org/10.5897/AJBX12.021>.
- Simmons, E. G. 2007. *Alternaria: An Identification Manual. CBS Biodiversity Series. Vol. 6.* Utrecht, The Netherlands: CBS Fungal Biodiversity Centre.
- Singh, A., S. Srivastava, and H. B. Singh. 2007. “Short Communication E V Ect of Substrates on Growth and Shelf Life of *Trichoderma harzianum* and Its Use in Biocontrol of Diseases.” *Bioresource Technology* 98: 470–473.
- Singh, JS, and VC Pandey. 2015. “Efficient Soil Microorganisms: A New Dimension for Sustainable Agriculture and Environmental Development.” *Agric Ecosyst Environ* 140: 339–353.
- Soares, F. E. F., B. L. Sufiate, and J. H. Queiroz. 2018. “Nematophagous Fungi: Far beyond the Endoparasite, Predator and Ovicidal Groups.” *Agriculture and Natural Resources* 52 (1): 1–8.
- Stephan, Z. A., I. K. AL-Maamoury, and B.G. Antoon. 1988. “Newly



- Reported Hosts of Root-Knot Nematode in Iraq. *Int. Nematol. Net Work. Newsl.* 5 (3): 36–43.
- Stirling, GR. 1991. *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes Progress, Problems and Prospects.* Wallingford, UK: Wallingford, UK, CAB International.
- Swe, A, J Li, KQ Zhang, SB Pointing, R Jeewon, and KD Hyde. 2011. “Nematode-Trapping Fungi.” *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.* 1 (1): 1–26.
- Szabó, M. 2014. “Potential of *Trichoderma* Species and Nematode-Trapping Fungi to Control Plant-Parasitic Nematodes: In Vitro Confrontation and Gene Expression Assays Using *Caenorhabditis Elegans* Model System.” Szent István University.
- 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): 121–128.
- Tao, Ye, Chunling Xu, Chunfen Yuan, Honghong Wang, Borong Lin, Kan Zhuo, and Jinling Liao. 2017. “*Meloidogyne Aberrans* Sp. Nov. (Nematoda: Meloidogynidae), a New Root-Knot Nematode Parasitizing Kiwifruit in China.” *PLOS ONE* 12 (8): 1–22.
- Taylor, A. L., and J. N. Sasser. 1978. “Biology, Identification and Control of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* sp.)” N.C. State Univ. D.
- Thakkar, KN, SS Mhatre, and RY Parikh. 2010. “Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles.” *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 6 (2): 257–262.
- Tikhonov, V. E., L. V. Lopez-Llorca, J. Salinas, and H. B. Jansson. 2002. “Purification and Characterization of Chitinases from the Nematophagous Fungi *Verticillium Chlamydosporium* and *V. Suchlasporium*.” *Fungal Genetics and Biology* 35: 67–78.
- Timper, P. 2014. “Conserving and Enhancing Biological Control of Nematodes.” *J Nematol* 46: 75–89.
- Turatto, M. F., F. S. Dourado, J. E. Zilli, and G. R. Botelho. 2018. “Control Potential of *Meloidogyne Javanica* and *Ditylenchus* Spp. Using *Pseudomonas* Fluorescent and *Bacillus* Spp.” *Brazilian Journal of Microbiology* 49 (1): 54–58.
- Valero, M. Verma, S. K. Brar, R. D. Tyagi, and R. Y. Surampalli. 2007. “Antagonistic Fungi, *Trichoderma* Spp.: Panoply of Biological Control.” *Biochem. Engineer. J.* 37: 1–20.
- Vinale, F, E L Ghisalberti, K Sivasithamparam, R Marra, A Ritieni, R Ferracane, and S Woo. 2009. “Factors Affecting the Production of *Trichoderma Harzianum* Secondary Metabolites during the Interaction with Different Plant Pathogens.” *Letters in Applied Microbiology* 48:

- 705–711. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02599.x>.
- Waller, P. J. 2003. “Global Perspectives on Nematode Parasite Control in Ruminant Livestock: The Need to Adopt Alternatives to Chemotherapy, with Emphasis on Biological Control.” *Animal Health Research Reviews* 4 (1): 35–44.
- Waller, P J, M Faedo, and K Ellis. 2001. “The Potential of Nematophagous Fungi to Control the Free-Living Stages of Nematode Parasites of Sheep: Towards the Development of a Fungal Controlled Release Device.” *Veterinary Parasitology* 102: 299–308.
- Wang, B. L., Y. H. Chen, J. N. He, H. X. Xue, N. Yan, Z. j. Zeng, J. W. Bennett, K. Q. Zhang, and X. M. Niu. 2018. “Integrated Metabolomics and Morphogenesis Reveals Volatile Signaling of the Nematode-Trapping Fungus *Arthrobotrys Oligospora*.” *Appl. Environ. Microbiol.* 84 (9): 1–43. <https://doi.org/10.1128/AEM.02749-17>.
- Wang, Y., L. Sun, S. Yi, Y. Huang, S. C. Lenaghan, and M. Zhang. 2013. “Naturally Occurring Nanoparticles from *Arthrobotrys Oligospora* as a Potential Immunostimulatory and Antitumor Agent.” *Advanced Functional Materials* 23 (17): 2175–2184.
- Weber, R. W.S. 2009. “Recent Developments in the Molecular Taxonomy of Fungi.” In *The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research)*, vol. 15, 1–15. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Weile, J., and C. Knabbe. 2009. “Current Applications and Future Trends of Molecular Diagnostics in Clinical Bacteriology.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394 (3): 731–742.
- Weindling, and Emerson. 1936. “The Isolation of a Toxic Substance from the Culture Filtrate of *Trichoderma*.” *Phytopathology* 26: 1068–70.
- Whiley, D. M, and T. P Sloots. 2005. “Sequence Variation in Primer Targets Affects the Accuracy of Viral Quantitative PCR.” *Journal of Clinical Virology* 34: 104–107.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. “Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics.” *PCR Protocols*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.
- Yamagami, T, M Tanigawa, I Masatsune, and G Funatsu. 1998. “Complete Amino Acid Sequence of Chitinase-A from Leaves of Pokeweed.” *Biosci Biotechnol Biochem* 62 (4): 825–828.
- Yan, C., W. Zhe, M. Fang, and Z. Wang. 2011. “Biological Control of the Pinewood Nematode *Bursaphelenchus Xylophilus* by Application of the Endoparasitic Fungus *Esteya Vermicola*.” *BioControl* (2011) 56: 91–100. <https://doi.org/10.1007/s10526-010-9302-1>.
- Yang, J, B Tian, and L Liang. 2007. “Extracellular Enzymes and the

- Pathogenesis of Nematophagous Fungi” *Appl Microbiol Biotechnol.* 75(1):21-31. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0881-4>.
- Yang, J, L Wang, X Ji, Y Feng, X Li, and C Zou. 2011. “Genomic and Proteomic Analyses of the Fungus *Arthrobotrys Oligospora* Provide Insights into Nematode-Trap Formation.” *PLoS Pathog.* 7 (9): 1–12.
- Yang, Y, E Yang, Z An, and X Liu. 2007. “Evolution of Nematode-Trapping Cells of Predatory Fungi of the Orbiliaceae Based on Evidence from rRNA-Encoding DNA and Multiprotein Sequences.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (20): 8379–8384.
- Yu, Z, M Mo, Y Zhang, and K Zhang. 2014. “Taxonomy of Nematode-Trapping Fungi from Orbiliaceae, Ascomycota.” In *Nematode-Trapping Fungi*, 41. New York: Springer Dordrecht, New York.
- Yuen, G Y, K C Broderick, C C Jochum, C J Chen, and E P Caswell-chen. 2017. “Control of Cyst Nematodes by *Lysobacter Enzymogenes* Strain C3 and the Role of the Antibiotic HSAF in the Biological Control Activity.” *Biological Control*, 1–31.
- Zhang, K. Q., and K. D. Hyde. 2014. *Nematode-Trapping Fungi*. Springer Dordrecht Heidelberg. B.V., Dord. New York: Springer.
- Zhang, W, Xiaoli Cheng, Xingzhong Liu, and Meichun Xiang. 2016. “Genome Studies on Nematophagous and Entomogenous Fungi in China.” *Journal of Fungi* 2 (9): 1–14.
- Zhang, X, and L Xia. 2017. “Expression of *Talaromyces Thermophilus* Lipase Gene in *Trichoderma Reesei* by Homologous Recombination at the *Cbh1* Locus.” *J Ind Microbiol Biotechnol* 44: 1–9.
- Zhang, Y., G. H. Li, and K. Q. Zhang. 2011. “A Review on the Research of Nematophagous Fungal Species (In Chinese).” *Mycosystema* 30: 836–845.

Appendix (1) Drechslerella brochopaga strain 701 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank:AY773456.1

>1 ITS1

CAGTGGCCCCCGCCGCGCGTCTTGGCTTCGGCCCTGAAGCTTCA  
 ACCTTTTGTGAACCAAACCTTTCTTTTCGCTTCGGCAGCAGCGGCG  
 GTCCCGTCGCGTCGGCCTGCCGTTAGCACCATTGAAAACCTGCTGT  
 ATCTCATGTCTGAACACGAATATTTTGAATTCAATCAAACTTTCA  
 ACAACGGATCTCTTGGTTCCCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA  
 CGCGATAGTTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTC  
 TTTGAACGCATATTGCGCCCATTGGCATTCCATTGGGCATGTCTGT  
 TTGAGCGTCATTTCAAACCCTCGACTTTGGTCGGTATTGAGCCGGC  
 TTTACGGGTGCGAACCCAGGCCGGTTTTAAAGTGGTAGGCTTTGC  
 TGTCTGCTGCTCCAAACCAAAAACATAGTAAACTGTACTTGTGAT  
 GGCGGGGTGGCTCCAGCCTTGAAAATGACACTTTGTGGTTTGACC  
 TCAGATCAGACAAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAG  
 CGGAGGAAAGGACATTACAAAAAGATAAATCAGGGTTCGGCCTA  
 AAAACCCCCCTTTTGTGCCCGAGCCTTCCTT



# Appendix

>1\_ITS4

GAACTTGGGACTTTGTCTGATCTGAGGTCAACCACAAAGTGT  
CATTTTCAAGGCTGGAGCCACCCCGCCATCAACAAGTACAGTT  
TACTATGTTTTTTGGTTTGGAGCAGCAGACAGCAAAGCCTACCA  
CTTTAAAACCGGCCTGGGTTTCGCACCCGTAAAGCCGGCTCAAT  
ACCGACCAAAGTCGAGGGTTTGAATGACGCTCAAACAGACA  
TGCCCAATGGAATGCCAATGGGCGCAATATGCGTTCAAAGACT  
CGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTA ACTATCGCGTTT  
CGCTGCGTTCTTCATCGATGCGGGAACCAAGAGATCCGTTGTT  
GAAAGTTTTGATTGAATTCAA AATATTCGTGTT CAGACATGAG  
ATACAGCAGGTTTTCAATGGTGCTAACGGCAGGCCGACGCGAC  
GGGACCGCCGCTGCTGCCGAAGCGAAAAGAAAGGTTTTGGTTC  
ACAAAAGGTTGAAGCTTTCAGGGCCGAAGCCAAGATTGCTCTG  
TTTTGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAGGATCA  
TTACCAAACAGAGCAATCTTGGCTTCGGCCCTGAAAGCTTCA  
ACCTTTTGTGAACCAAACCTTTCTTTTCGCCACGGCAGTCCGTG  
CGCCGCCTGCCTTTACCCTTTGAAAACCGT



>1\_ITS1

TTGGCTTCGGCCCTGAAGCTTCAACCTTTTGTGAACCAAACCTT  
TCTTTTCGCTTCGGCAGCAGCGGCGGTCCCGTCGCGTCGGCCT  
GCCGTTAGCACCATTGAAAACCTGCTGTATCTCATGTCTGAAC  
ACGAATATTTTGAATTCAATCAAACTTTCAACAACGGATCTC  
TTGGTTCCCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATAGTT  
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACG  
CATATTGCGCCATTGGCATTCCATTGGGCATGTCTGTTTGAGC  
GTCATTTCAAACCCTCGACTTTGGTCGGTATTGAGCCGGCTTTA  
CGGGTGCGAACCCAGGCCGGTTTTAAAGTGGTAGGCTTTGCTG  
TCTGCTGCTCCAAACCAAAAACATAGTAAACTGTACTTGTTGA  
TGGCGGGGTGGCTCCAGCCTTGAAAATGACACTTTGTGGTTTG  
ACCTCAGATCAGACAAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA  
ATAAGCGGAGGAAAGGA

>1\_ITS4\_

GATCTGAGGTCAACCACAAAGTGTCATTTTCAAGGCTGGAGCC  
ACCCCGCCATCAACAAGTACAGTTTACTATGTTTTTGGTTTGGGA  
GCAGCAGACAGCAAAGCCTACCACTTTAAAACCGGCCTGGGTT  
CGCACCCGTAAAGCCGGCTCAATACCGACCAAAGTCGAGGGTT  
TGAAATGACGCTCAAACAGACATGCCCAATGGAATGCCAATG  
GGCGCAATATGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTG  
CAATTCACATTA ACTATCGCGTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATG  
CGGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTGAATTCA  
AAATATTCGTGTTTCAGACATGAGATACAGCAGGTTTTCAATGG  
TGCTAACGGCAGGCCGACGCGACGGGACCGCCGCTGCTGCCG  
AAGCGAAAAGAAAGGTTTGGTTCACAAAAGGTTGAAGCTTTC  
AGGGCCGAAGCCAAGATTGCTCTGTTTTGGTAATGATCCTTCC  
GCAGGTTACCTACGGAAGGATCATTACCAAAAACAGAGCAAT  
CTTGGCTTCGGCCCTGAAAGCTTCAACCTTTTGTGAACCAAAC  
CTTTCTTTTCGCCACGGCAGTCCGTGCGCCGCCTGCCTTTACCC  
TTTGAA

# Appendix

Arthrobotrys brochopaga internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence

Sequence ID: U51950.1 Length: 963 Number of Matches: 2  
Range 1: 405 to 963

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
966 bits(523)	0.0()	547/559(98%)	0/559(0%)	Plus/Plus	

Features:

Query	118	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCAAAACAGAGCAATCTTGGCTTCGGCC	177
Sbjct	485	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCAAAACAGAGCAATCTCGGCTTCGGCC	464
Query	178	TGAAAGCTTCAMCCCTTTGTGAACCAAMCCCTTCTTTCCGCTTCGGCAGCAGCGGGCGTC	237
Sbjct	465	TGAAAGCTTCAMCCCTTTGTGAACCAAMCCCTTCTTTCCGCTTCGGCAGCAGCGGGCGATC	524
Query	238	CCGTCGCGCTCGGCTGCGCTTAGCACCATTGAAAACCTGCTGTATCTCATGTCTGAACAC	297
Sbjct	525	CCGTCGCGCTCAGCTGCGCTAGCACCTTGAAAACCTGCTGTATCTCATGTCTGAACAC	584
Query	298	GAATATTTGAAATCAATCAAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGCCGATCGATGA	357
Sbjct	585	GAATATTTGAAATCAATCAAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGCCGATCGATGA	644
Query	358	AGAACCAGCGAAMCGGATAGTTAATGTGAATTGCAGAAATCAGTGAATCATCGAGTCT	417
Sbjct	645	AGAACCAGCGAAMCGGATAGTTAATGTGAATTGCAGAAATCAGTGAATCATCGAGTCT	704
Query	418	TTGAACGCATATGCGCCCAATGGCAATCCATTGGGCATGTCTGTTGAGCGTCAATTC	477
Sbjct	705	TTGAACGCATATGCGCCCAATGGCAATCCATTGGGCATGTCTGTTGAGCGTCAATTC	764
Query	478	AACCCCTCGACTTGGTCGGTATTGAGCCGGCTTACGGGTGCGAACCCAGGCCGGTTA	537
Sbjct	765	AACCCCTCGACTTGGTCGGTATTGAGCTGGCTTACGGGTGCGAACCCAGGCCGGTTA	824
Query	538	AAGTGGTAGGCCTTGTCTGTCTGCTCCAAACCAAAAACATAGTAACTGTACTTGTG	597
Sbjct	825	AAGTGGTAGGCCTTGTCTGTCTGCTCCAAACCAAAAACATAGTAACTGTACTTGTG	884
Query	598	ATGGCGGGGTGGCTCCAGCCTTGAAAATGACACTTTGTGGTTGACCTCAGATCAGACAA	657
Sbjct	885	ATGGTGGGTGGCTCCAGCCTTGAAAATGACACTTTGTGGTTGACCTCAGATCAGACAA	944
Query	658	GGATACCCCGCTGAACCTAA 676	
Sbjct	945	GGATACCCCGCTGAACCTAA 963	

Appendix (2) Arthrobotrys oligospora strain XJ-A1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KR106995.1

>2\_ITS1

GTGGGCCCTCCGTCAGGCCGGCCGGTTTGCTGTTGCAGCTTGTT  
CGAAGAGCGGTTGCGCTGTCTTCCGGTTGGTAAGCCAGCACCC  
GCCTTCCCCGCAAGGGGCAGGTTTGGGTACCTGGTAAACCCTT  
TGTGAACCAAAACAAACCTTTCGCTTCGGCAGCTGGGCCCCCGT  
CTGGGACCCGTCAGCCTGCCGCTAGCACCAAAACAAAAAACTT  
GTTGTCAAACATTGTCTGATAACCAAAATTTTCGAATGAAAA  
TCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCCGCATCGATGA  
AGAACGCAGCGAAACGCGATAGTTAATGTGAATTGCAGAATT  
CAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTGGT  
ATTCCTTTGGGCATGTCTGTTTGGCGTCAATTACAACCCTCAGC  
TACCCGCTGGTTTTTGAACCCGAACGGTGCCCCCTAACCGGGGA  
ACCGAGCCGGTTTTTAAAGTTGTAAGCTCTGCTGGCCGCTCCGC  
CCAACCAGAACATAGTAAAATACTACTTTTGTAGGGTCAAG  
CGGAACGGTTTTTTCGGCCTGAACAAAACCTACCCATTTTCAA  
GGTTTGACCTCAGATCAGACAAGGATACCCGCTGAACTTAAGC



# Appendix

ATATCAATAAGCGGGAGGAAAAAGGATCATTACCAATACAAG  
CCGGCGGTTTTGCTTTTGCACCTTGTTCAAAAAGGGTTGGCCT  
TTCCCCGGTTGGAAACCCCCCTTCCCCAGGGGGCGGTTT  
GGGGCACCGGGAAAAACCTTTTGTAAAAAAAAAAAAATTTTTT  
TCTTGTCCGCCTGGACCTTAACCCGCCCTCACAAAAAAAAAAC  
TTTTTTTAAAAAGTTTTTTTAAAAACATATTTTTGTAGAAA  
AAAATATCTCTTCTCGCCCGCTCTCCCCTCCCTTCCCCACACA  
AAATACACTCACACAATGCATTATTAACGTAATAATTTGTATA  
TACTATACTACTACGTGACTCTACGACTCTATTCCTTACCGACC  
CACATTATGCTGCTTCGTTCTCTC



>2\_ITS4

AAAAAAGTCGGGAACCTTGTCTGATCTGAGGTCAAACCTTGAA  
AAATGGGTAGGTTTTGTTTCAGGCCGAAAAACCGTTCGGCTTGA  
CCCTAACAAAAGTAGTATTTTACTATGTTCTGGTTGGGGCGGA  
GCGGCCAGCAGAGCTTACAACCTTAAAACCGGCTCGGTTCCCC  
GGTTAGGGGGCACCCTTCGGGTTCAAACAGCGGGTAGCTG  
AGGGTTGTAATGACGCTCAAACAGACATGCCCAAAGGAATAC  
CAATGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCCTGAA  
TTCTGCAATTCACATTA ACTATCGCGTTTCGCTGCGTTCTTCAT

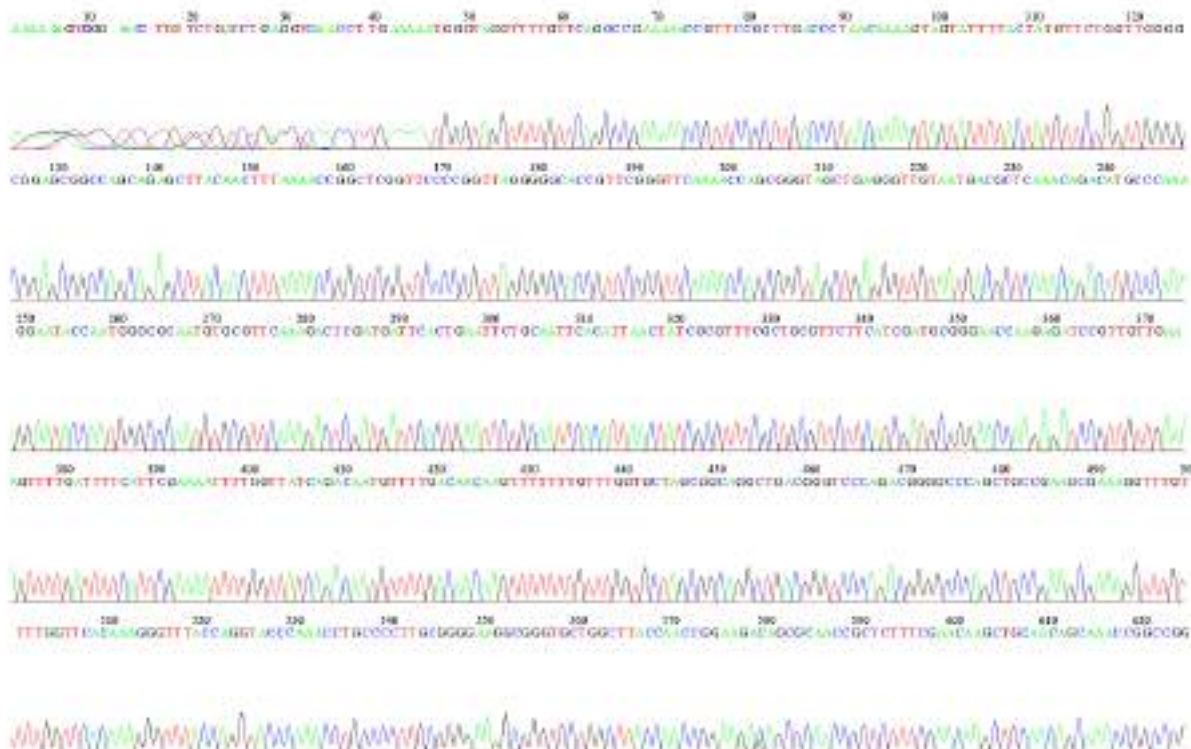


 *Appendix* 

---

CGATGCGGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTT  
CATTGAAAATTTTGGTTATCAGACAATGTTTTGACAACAAGT  
TTTTTTGTTTGGTGCTAGCGGCAGGCTGACGGGTCCCAGACGG  
GGCCCAGCTGCCGAAGCGAAAGGTTTGT TTTTGGTTCACAAAGG  
GTTTACCAGGTACCCAAACCTGCCCTTGCGGGGAAGGCGGGT  
GCTGGCTTACCAACCGGAAGACAGCGCAACCGCTCTTTCGAAC  
AAGCTGCAACAGCAAACCGGCCGGCTTGTATTGGTAATGATCC  
TTCCGCAGGTTACCTACGGAAGGATCATTACCAATACAAGCC  
GGCCGGTTTGTCTGTTGCAGCTTGTTCGAAAGAGCGGTTGCGCT  
GTCTTGGGGGTGGTAAGCCAGCACCCGCCTTCGCCGGAAGGGG  
CAGGTTTGGGAACCTGTTAAACCCATTGTAAACCAAACAAAC  
CTCCGCTTCGGCAGCTGCGCCCCGTCTGAGAAAAAAAAAATCT  
TGCCGCAAACTCTGGATCAAAAAAAAAACTTGTGTCAAAAACAT  
TGTTATAATAACCAAATTTTTTCGAATGAAAATCCAAAAC TTT  
TCACCAACGGAACCTCTTGGTTTCCGCCATCGATAGAGAAACG  
CAGCGAAACGCGAAAGTTTAATGTTGAATTGCCGGACTCCCGT  
GGAACCATCCGGGTTTTTTTGAACGGCCCTTTGTGCCCCATTG  
GCTATTCCCTTTGGGGCAGGTCCGGTTTAGAACGTCAATTACA  
ACCCCCCGCCCAACCCGCCGGGAATTTAAAAACCTAAAACGG  
TTTCTCCTTAAACCGGGGGAAACCAAGGCCGGGTTTTAAAAA  
TTTAAAAGCCTTTTTTTTGGTGCGGTCCGGGCCCAAACCAAAA  
AAAAC TCGTAAAAATTACTATTATTTTAATTAAGGGTAAAAA  
AGGGAACGAAATTTTTTCGGGCCCTGGAAAAAAAAAACCCACC  
CCATTTTTTTGTGAAAGGGGTTG

File: 2 ITS4.ab1 Run Ended: 2016/09/23/22 Signal: G:497 A:467 C:389 T:334  
 Sample: 2 ITS4 Lane: 16 Base pairing: 15149/17 1354 bases of 19935 reads Page 1 of 2



>2 ITS1

TGTTGCAGCTTGTTCGAAGAGCGGTTGCGCTGTCTTCCGGTTGG  
 TAAGCCAGCACCCGCCCTCCCCGCAAGGGGCAGGTTTGGGTAC  
 CTGGTAAACCCTTTGTGAACCAAAACAAACCTTTCGCTTCGGC  
 AGCTGGGCCCCGTCTGGGACCCGTCAGCCTGCCGCTAGCACCA  
 AACAACAAAAAACTTGTGTCAAAACATTGTCTGATAACCAAAAT  
 TTTCGAATGAAAATCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTT  
 CCCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATAGTTAATGT  
 GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT  
 TGCGCCATTGGTATTCCTTTGGGCATGTCTGTTTGAGCGTCAT  
 TACAACCCTCAGCTACCCGCTGGTTTTGAACCCGAACGGTGCC  
 CCTAACCGGGGAACCGAGCCGGTTTTAAAGTTGTAAGCTCTG  
 CTGGCCGCTCCGCCCAACCAGAACATAGTAAAATACTACTTT  
 TGTTAGGGTCAAGCGGAACGGTTTTTCGGCCTGAACAAAACCT  
 ACCATTTTTCAAGGTTTGACCTCAGATCAGACAAGGATACCC  
 GCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGGAGGAAAAAGGATCA  
 TTACCAATACAAGCCGGCGGTTTT

>2\_ITS4

TGATCTGAGGTCAAACCTTGAAAAATGGGTAGGTTTTGTTCAG  
GCCGAAAACCGTTCCGCTTGACCCTAACAAAAGTAGTATTTT  
ACTATGTTCTGGTTGGGGCGGAGCGGCCAGCAGAGCTTACAAC  
TTAAAACCGGCTCGGTTCCCCGGTTAGGGGGCACCGTTCGGG  
TTCAAACAGCGGGTAGCTGAGGGTTGTAATGACGCTCAAAC  
AGACATGCCCAAAGGAATACCAATGGGCGCAATGTGCGTTCA  
AAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTA ACTAT  
CGCGTTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCGGGAACCAAGAGATC  
CGTTGTTGAAAGTTTTGATTTTCATTCGAAAATTTTGGTTATCA  
GACAATGTTTTGACAACAAGTTTTTTTTGTTTGGTGCTAGCGGCA  
GGCTGACGGGTCCCAGACGGGGCCCAGCTGCCGAAGCGAAAG  
TTTTGTTTTGGTTCACAAAGGGTTTACCAGGTACCCAAACCTG  
CCCCTTGCGGGGAAGGCGGGTGCTGGCTTACCAACCGGAAGA  
CAGCGCAACCGCTCTTTCGAACAAGCTGCAACAGCAAACCGGC  
CGGCTTGTATTGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGA  
AGGATCATTACCAATACAAGCCGGCCGGTTTGCTGTTGCAGCT  
TGTTCGAAAGAGCGGTTGCGCTGT

Arthrobotys oligospora strain XJ-A1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
 Sequence ID: KR106995.1 Length: 687 Number of Matches: 2  
 Range 1: 1 to 687

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1243 bits(673)	0.0()	684/689(99%)	2/689(0%)	Plus/Plus	

Features:

```

Query 68 TCCGTAGGTGAACTGCCGAAGGATCATACCAATACAAGCCGGCCGGTTGCTGTGCA 127
Sbjct 1 TCCGTAGGTGAACTGCCGAAGGATCATACCAATACAAGTCGGCCGGTTGCTGTGCA 68
Query 128 GCTGTTCGAAAGAGCGTTCCGCTGTCTCCGGTTGGTAAGCCAGCACCCGCTTCCCC 187
Sbjct 61 GCTGTTCGAAAGAGCGTTCCGCTGTCTCCGGTTGGTAGGCCAGC4CCCGCC-TCCCC 119
Query 188 GCAGGGGGCAGGTTTGGGTACCTGGTAACCCCTTTGTGAACCAAAACAACCTTCGCTT 247
Sbjct 128 GCAGGGGGCAGGTTTGGGTACCTGGTAACCCCTTTGTGAACCAAAACAACCTTCGCTT 179
Query 248 CCGCAAGCTGGGCCCCGCTCGGACCCGTCAGCTGCCGCTAGCACCAAAACAAAAAATT 307
Sbjct 189 CCGCAAGCTGGGCCCCGCTCGGACCCGTCAGCTGCCGCTAGCACCAAAACAAAAAATT 239
Query 308 GTTGTCAAAACATTTGCTGATAAACCAAAATTTTGAATGAAAATCAAAATTCACAAAC 367
Sbjct 240 GTTGTCAAAACATTTGCTGATAAACCAAAATTTTGAATGAAAATCAAAATTCACAAAC 209
Query 368 GGATCTCTTGGTCCCGCATCGATGAAGAACCGCAGCGAAACCGGATAGTTAATGTGAAT 427
Sbjct 300 GGATCTCTTGGTCCCGCATCGATGAAGAACCGCAGCGAAACCGGATAGTTAATGTGAAT 359
Query 428 GCAGAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTCGCCCCATTTGGTATTCCTTTG 487
Sbjct 360 GCAGAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTCGCCCCATTTGGTATTCCTTTG 419
Query 488 GGCATGCTCTGTTGAGCGTCAATACAAACCTCAGCTACCCGCTGGTTTGAACCCGAAACG 547
Sbjct 428 GGCATGCTCTGTTGAGCGTCAATACAAACCTCAGCTACCCGCTGGTTTGAACCCGAAACG 479
Query 548 GTGCCCCCTAAACCGGGAAACCGAGCCGGTTTAAAGTTGTAAAGCTCTGCTGGCCGCTCCG 607
Sbjct 480 GTGCCCCCTAAACCGGGAAACCGAGCCGGTTTAAAGTTGTAAAGCTCTGCTGGCCGCTCCG 539
Query 608 CCCCACCCAGAACATAGTAAATACTACTTTTGTAGGGTCAAGCGGAAACGGTTTTCCG 667
Sbjct 540 CCCCACCCAGAACATAGTAAATACTACTTTTGTAGGGTCAAGCGGAAACGGTTTTCCG 509
Query 668 CCTGAACAAACCTACCCATTTTTCAAGGTTTGAACCTCAGATCAGACAAAGGATACCCGCT 727
Sbjct 600 CCTGAACAAACCTACCCATTTTTCAAGGTTTGAACCTCAGATCAGACAAAGGATACCCGCT 659
Query 728 GAACTTAAGCATATCAATTAAGCCGGAGGA 756
Sbjct 660 GAACTTAAGCATATCAATTAAGCCGG-AGGA 687
    
```

Appendix (3) Orbiliaceae sp. strain SA228 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KX953548.1

>3 ITS1

```

GGCTTCGGGAGTGAGTATCCTTTTTTCCTACCTGCTCGGTGGCCC
TTGGGTCACCGGACCGGTCAACCCTTTGTGAACCAAAAAACCT
TTTTCGCTTCGGCAGCTGGGCCCCGACCCGGCCCGTCAGCCTG
CCGTTAGCACCCAACCGAAAAACCTGTTGTCAAACATATGTC
TGATAACCAAAATTTTCGAATGAAAATCAAACCTTCAACAAC
GGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAAAACGCAGCGAAACGC
GATATTTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCT
TTGAACGCCCATTTGCGCCCATTTGGTATTCCTTTGGGCATGTCTG
TTGAGCGTCATTACAACCCCTCAGCTAACGCTGGTTTTGAACC
GGACAGGTTTGTTCACACCCCGCACCCGGTTTTAAAGTTGT
AAGCTCTGCTGGCTGCTCTGCCCCAACCGGAACATAGTAAAT
AAAAAAAACCTACTTGTTCATAGGTGAGGCGGAAAGCGGTACG
GCCTGAACAAAACCTACCCATCTAAGGTTTGACCTCAGATCAA
    
```

ACAAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG  
GGACAGATCAAACAAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA  
ATAAGCGGAGGAACC



>3 ITS4

TTACTGGGTACCTCAGCCTGGATCTGAGGTCACACCTCTAGAA  
TGAGGTGAGGTTGTTGTTCCAGGCCGTACCGCTTTCGCCTCAC  
CTCTGAAGAAGTAGTTTTTTTTATTTTACTATGTTCCGGTTGGG  
GCAGAGCAGCCAGCAGAGCTTACAACCTTAAAACCGGTGCGG  
GTGTGTGAAAACAAACCTGTCCCGGTGCAAACCAGCGTTAGC  
TGACGGGTTGGAATGACGCTCAAACAGACATGCCCAAAGGAA  
TACCAATGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACT  
GAATTCTGCAATTCACATTA ACTATCGCGTTTTCGCTGCGTTCTT  
CATCAATGCGGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAT  
TTTCATTCGAAAATTTTGGTTATCAGACATATGTTTTGACAACA  
GGTTTTTCGGTTGGGTGCTAACGGCGGGCTGACGGGCGGGGTC  
GGGCCCAGCTGCCTAAGCGAAAAGGTTTTTTGGTTCACAAA  
GGGTTGACCGGTCCGGTGACCCACGGGCCACCGACTAGGTAG  
GAAAAGTGATTTATCACTCTTTTGGAAATGGATCCTTCAGCAG  
GTTACCTACGGAAACCTTGTTACGATTTTTACTTCCAAAATCC

TTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTC  
CGAAACGTTTCCCTCTGGAAGACTACGTG



>3 ITS1

CCTGCTCGGTGGCCCTTGGGTCACCGGACCGGTCAACCCTTTG  
TGAACCAAAAAACCTTTTTTCGCTTCGGCAGCTGGGCCCCGACC  
CGGCCCGTCAGCCTGCCGTTAGCACCCAACCGAAAAACCTGTT  
GTCAAACATATGTCTGATAACCAAAATTTTCGAATGAAAATC  
AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCCGCATCGATGAAA  
AACGCAGCGAAACGCGATATTTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
TGAATCATCGAGTCTTTGAACGCCATTGCGCCCATTTGGTATTC  
CTTTGGGCATGTCTGTTTGGAGCGTCATTACAACCCCTCAGCTAA  
CGCTGGTTTTGAACCGGGACAGGTTTGTTCCTCCACACCCGCA  
CCGGTTTTAAAGTTGTAAGCTCTGCTGGCTGCTCTGCCCAACC  
GGAACATAGTAAAATAAAAAAACTACTTGTTCATAGGTGAG  
GCGGAAAGCGGTACGGCCTGAACAAAACCTACCCATCTAAGG  
TTTGACCTCAGATCAAACAAGGATACCCGCTGAACTTAAGCAT  
ATCAATAAGCG



# Appendix

>3 ITS4

GCCGTACCGCTTTC CGCCTCACCTCTGAAGAAGTAGTTTTTTTT  
 ATTTTACTATGTTCCGGTTGGGGCAGAGCAGCCAGCAGAGCTT  
 ACAACTTTAAAACCGGTGCGGGTGTGTGAAAACAAACCTGTCC  
 CGGTGCAAAACCAGCGTTAGCTGACGGGTTGGAATGACGCTCA  
 AACAGACATGCCCAAAGGAATACCAATGGGCGCAATGTGCGT  
 TCAAAGACTCGATGATTCACCTGAATTCTGCAATTCACATTAAC  
 TATCGCGTTTTCGCTGCGTTCTTCATCAATGCGGGAACCAAGAG  
 ATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTTCATTCGAAAATTTTGGTTA  
 TCAGACATATGTTTTGACAACAGGTTTTTCGGTTGGGTGCTAAC  
 GGCGGGCTGACGGGCCGGGTCGGGGCCCAGCTGCCTAAGCGA  
 AAAAGGTTTTTTGGTTCACAAAGGGTTGACCGGTCCGGTGACC  
 CACGGGCCACCGACTAGGTAGGAAAAAGTGATTTATCACTCTT  
 TTGGAATGGATCCTTCAGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTT  
 A

Orbiliaceae sp. strain SA228 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence  
 Sequence ID: **KX953548.1** Length: 590 Number of Matches: 1  
 Range 1: 1 to 590

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
990 bits(536)	0.0()	576/594(97%)	7/594(1%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 44	AAAAGAGTGATAAATCAC	TTTTTCTCTACCTAGTCGGTGG	CCCCTGGGTCACCGGACCGGT		182
Sbjct 1	AAAAGAGTGAGAAATCAC	TTTTTCTCTACCTGCTCGGTGGCCCT	TTGGGTCACCGGACCGGT		68
Query 183	CAACCCCTTTGTGAACCAAAAAACCT	TTTTTCGCTTAGGCAGCTGGGCCCCG	GACCCGGCCCG		162
Sbjct 61	CAACCCCTTTGTGAACCAAAAAACCT	TTTTTCGCTTAGGCAGCTGGGCCCTG	GACCCGGCCCG		128
Query 163	TCAGCCCGCCGTAGCACCCCAACCGAAAAACCT	TTGTGTCAAAACATATGCTGATAACCA			222
Sbjct 121	TCAGCCTGCCGTTAGCACCCCAACCGAAAAACCT	TTGTGTCAAAACATATGCTGATAACCA			188
Query 223	AAATTTTCGAATGAAAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCT	TTGGTCCCAGCATCGATGA			282
Sbjct 181	AAATTTTCGAATGAAAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCT	TTGGTCCCAGCATCGATGA			248
Query 283	AAAACGACGCGAAACCGGATAGTTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAGTCT				342
Sbjct 241	AGAACGACGCGAAACCGGATAGTTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAGTCT				308
Query 343	TTGAACGCACATTCGCGCCCATGGTATTCCTTTGGGCATGTCTGTTGAGCGTCATTACA				402
Sbjct 301	TTGAACGCACATTCGCGCCCATGGTATTCCTTTGGGCATGTCTGTTGAGCGTCATTACA				368
Query 403	ACCCCTCAGCTAACGCTGGTTTTGAACCGGGACAGGTTTTGTTTTACACAC-CC-GCACC				468
Sbjct 361	ACCCCTCAGCTAACGCTGGTTTTGAACCGGGACAGGTTTTGTTTTACACACACCTGCACC				428
Query 461	GGTTTTAAAGTTGTAAGCTCTGCTGGCTGCTTGCCCCAACCGGAACATAGTAAAAAT				520
Sbjct 421	GGTTTTAAAGTTGTAAGCTCTGCTGGCTGCTTGCCCCAACCGGAACATAGTAAAAAAC				479
Query 521	aaagcctacttcttcagagggtgagccgggaaagccgtacggcctgaacaaaaacctaccat				588
Sbjct 489	---aaactacttcttcagagggtgagccgggaaagccgtacggcctgaacaaaaacctaccat				536
Query 581	CTAAGGTTTTGACCTCAGATCAAAACAGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAA				634
Sbjct 537	CTAAGGTTTTGACCTCAGATCAGAACAGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAA				598

# Appendix

Appendix (4) Orbiliaceae sp. strain SA228 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KX953548.1

>7 ITS1

```
CAACTGCCGTCTTGGCGTGCCGCTCACTTTTTCTACCTGCTCG
GTGGCCCTTGGGTCACCGGACCGGTCAACCCTTTGTGAACCAA
AAAACCTTTTTCGCTTCGGCAGCTGGGCCCCGACCCGGCCCGT
CAGCCTGCCGTTAGCACCCAACCGAAAAACCTGTTGTCAAAC
ATATGTCTGATAACCAAAATTTTCGAATGAAAATCAAACCTTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCCCGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAACGCGATAGTTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCATTGGTATTCCTTTGGGC
ATGTCTGTTTGAGCGTCATTACAACCCCTCAGCTAACGCTGGTT
TTGAACCGGGACAGGTTTGTTTTTCACACACCCGCACCGGTTTT
AAAGTTGTAAGCTCTGCTGGCTGCTCTGCCCCAACCGGAACAT
AGTAAAATAAAAAAAACTACTTGTTCAGAGGTGAGGCGGAAA
GCGGTACGGCCTGAACAAAACCTACCCATCTAAGGTTTGACCT
CAGATCAGACAAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA
GCGGAGGAAAAAGGACCTGGCGCACAAAGTAGAAGGTAC
```





>7 ITS4

AGGGACTGGTACTTGTCTGATCTGAGGTCAACCTTAGATGGGT  
AGGTTTTGTTTCAGGCCGTACCGCTTCCCGCCTCACCTCTGAACA  
AGTAGTTTTTTTTTATTTTACTATGTTCCGGTTGGGGCAGAGCAG  
CCAGCAGAGCTTACAACCTTTAAAACCGGTGCGGGTGTGTGAAA  
ACAAACCTGTCCCGGTTCAAACCAGCGTTAGCTGAGGGGTTG  
TAATGACGCTCAAACAGACATGCCCAAAGGAATACCAATGGG  
CGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCA  
ATTCACATTA ACTATCGCGTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCG  
GGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTTCATTCGA  
AAATTTTGGTTATCAGACATATGTTTTGACAACAGGTTTTTCGG  
TTGGGTGCTAACGGCAGGCTGACGGGCCGGGTTCGGGGCCAG  
CTGCCGAAGCGAAAAAGGTTTTTTGGTTCACAAAGGGTTGACC  
GGTCCGGTGACCCAAGGGCCACCGAGCAGGTAGGAAAAAGTG  
ATTTCTCACTCTTTTGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTAC  
GGAAGGATCATTACCAAAGAGTGAGAAATCACTTTTTCTAC  
CTGCTCGGTGGCCCTTGGGTCACCGGACCGGTCAACCCTTTGT  
GAACCAAAAAACCTTTTTTCGCTTCGGCAGCTGGGCCTCGACCC  
GGCCTGTCAGCCTGCCGTTAGCACCCAACAAAAAACCTGTTG  
TCAAACATATGTCTGAAAACCAAATTTTCGAATGAAAATCA  
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCCGCATCGATGAAGA  
ACGCAGCGAAACGCGATAGTTAATGTGAATTGCAGAAATTCA  
GTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTGGTAT  
TCCTTTGGGCATGTCTGTTGGAGCGTCATTACAACCCCTCAGCT  
AACGCTGGTTTTTTGAACCGGGGACAGGTTTGTTTTTCAACAAC  
CCGCAACCGGTTTTTAAAGTTGGTAAGGCCTGGCTGGCCTGCC  
CCGGCCCCCAACCGGGAACAAAGGTAAAATTAATAAAAAAACT  
ACCTGGTTCCAAAGGTTGAGGCGGGAAAGCCGGAACGGCCCT  
GAAACCAAACCTAACCTATTCAAGGGTTTGGACCTCCGAATCC  
AGACAAGGGTAACCCGCCTGGACCTTAGGCAATTCAAATTA  
CCCGAAGGGAATTTAAAAAACTTTAAATTTTGA

File: 2\_ITS4k1 Run Date: 20/09/2018 2:28:22 Signal: 0.004 A=45 C=30 T=302  
 Sample: 2\_ITS4 Lane: 14 Base pairing: 14/21508 1251 bases in 21510 score Page 1 of 2



>7\_ITS1

TCCTACCTGCTCGGTGGCCCTTGGGGTCACCGGACCGGTCAACC  
 CTTTGTGAACCAAAAAACCTTTTTTCGCTTCGGCAGCTGGGCCC  
 CGACCCGGCCCGTCAGCCTGCCGTTAGCACCCAACCGAAAAAC  
 CTGTTGTCAAACATATGTCTGATAACCAAAATTTTCGAATGA  
 AAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCCGCATCGA  
 TGAAGAACGCAGCGAAACGCGATAGTTAATGTGAATTGCAGA  
 ATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCATT  
 GGTATTCCTTTGGGCATGTCTGTTTGAGCGTCATTACAACCCCT  
 CAGCTAACGCTGGTTTTGAACCGGGACAGGTTTGTTTTCACAC  
 ACCCGCACCGGTTTTAAAGTTGTAAGCTCTGCTGGCTGCTCTGC  
 CCAACCGGAACATAGTAAAATAAAAAAACTACTTGTTCAG  
 AGGTGAGGCGGAAAGCGGTACGGCCTGAACAAAACCTACCCA  
 TCTAAGGTTTGACCTCAGATCAGACAAGGATACCCGCTGAACT  
 TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAGGAC

>7\_ITS4

CTGATCTGAGGTCAACCTTAGATGGGTAGGTTTTGTTCAGGCC  
 GTACCGCTTTCCGCCTCACCTCTGAACAAGTAGTTTTTTTTTATT  
 TTAATATGTTCCGGTTGGGGCAGAGCAGCCAGCAGAGCTTACA  
 ACTTTAAAACCGGTGCGGGTGTGTGAAAACAAACCTGTCCCGG  
 TTCAAACACAGCGTTAGCTGAGGGGTTGTAATGACGCTCAAAC

# Appendix

AGACATGCCCAAAGGAATACCAATGGGCGCAATGTGCGTTCA  
 AAGACTCGATGATTCACCTGAATTCTGCAATTCACATTA  
 ACTATCGCGTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGGGAACCAAGAGATC  
 CGTTGTTGAAAGTTTTGATTTTCATTCGAAAATTTTGGTTATCA  
 GACATATGTTTTGACAACAGGTTTTTCGGTTGGGTGCTAACGG  
 CAGGCTGACGGGCCGGGTCTGGGGCCCAGCTGCCGAAGCGAAA  
 AAGGTTTTTTGGTTCACAAAGGGTTGACCGGTCCGGTGACCCA  
 AGGGCCACCGAGCAGGTAGGAAAAAGTGATTTCTCACTCTTTT  
 GGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAGGATCATTAC  
 CAAAAGAGTGAGAAATCACTTTTTCTACCTGCTCGGTGGCCC  
 TTGGGTCACCGGACCGGTCAACCCTTTGTGAACCAAAAAACCT  
 TTTTCGCTTCGGCAGCTGGGCCTCGACCCGGCCTGTCAGCCTGC  
 CGTTAGCACCCAAACAAAAAACCTGTTGTCAAACATATGTCT  
 GAAAACCAAAATTTTTCGAATGAAAATCAAACCTTTCAACAACG  
 GATCTCTTGGTTCCCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCG  
 ATAGTTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAGTCT  
 TTGAACGCACATTGCGCCCATTGGTATTCCTTTGGGCATGTCTG  
 TTGGAGCGTCATTACAACCCTCAGCTAACGCTGG

Orbiliaceae sp. strain SA228 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence  
 Sequence ID: **KX953548.1** Length: 590 Number of Matches: 2  
 Range 1: 1 to 590

Score	Expect	Identifies	Gaps	Strand	Frame
1040 bits(563)	0.0()	585/594(98%)	7/594(1%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 426	AAAGAGTGAGAAATCAC	TTTTTCTACCTGCTCGGTGG-CCCTTGGGTACCGGACCGGT			484
Sbjct 1	AAAGAGTGAGAAATCAC	TTTTTCTACCTGCTCGGTGGCCCTTGGGTACCGGACCGGT			60
Query 485	CAACCCCTTTGTGAMCCAAAAAC	TTTTTTCGCTTCGGCAGCTGGGCCCGGACCCGGCCG			544
Sbjct 61	CAACCCCTTTGTGAMCCAAAAAC	TTTTTTCGCTTCGGCAGCTGGGCCCTGACCCGGCCG			120
Query 545	TCAGCCTGCGGTAGCACCCAAACCGAAAAAC	TGTTGTCAAACATATGTCGATAACCA			604
Sbjct 121	TCAGCCTGCGGTAGCACCCAAACCGAAAAAC	TGTTGTCAAACATATGTCGATAACCA			180
Query 685	AAATTTTTCGAATGAAATCAAAC	TTTCAACAAACGGATCTCTTGGTCCCAGATCGATGA			664
Sbjct 181	AAATTTTTCGAATGAAATCAAAC	TTTCAACAAACGGATCTCTTGGTCCCAGATCGATGA			240
Query 665	AGAACGCAGCGAAACCGGATAGTTAATGTGAATTGCAGAA	TTCAGTGAATCATCGAGTCT			724
Sbjct 241	AGAACGCAGCGAAACCGGATAGTTAATGTGAATTGCAGAA	TTCAGTGAATCATCGAGTCT			300
Query 725	TTGAACGCACATTGCGCCCATTTGGTATTC	TTTGGGCATGCTGTTGAGCGTCATTACA			784
Sbjct 381	TTGAACGCACATTGCGCCCATTTGGTATTC	TTTGGGCATGCTGTTGAGCGTCATTACA			360
Query 785	ACCCCTCAGCTAACGCTGG	TTTGAACCGGGACAGGTTGTTTACACAC-CC-GCACC			842
Sbjct 361	ACCCCTCAGCTAACGCTGG	TTTGAACCGGGACAGGTTGTTTACACACACCTGCACC			420
Query 843	GGTTTTAAAGTTGTAAAGCTCTGCTGGCTGCT	TGCCCCAACCGGAACATAGTAAAAAaaa			902
Sbjct 421	GGTTTTAAAGTTGTAAAGCTCTGCTGGCTGCT	TGCCCCAACCGGAACATAGTAAAAA-AAC			479
Query 983	aaaaaCTACTTGTTCAGAGGTGAGGCGGAAAGCGGTACG	GGCTGAAACAAACCTACCCAT			962
Sbjct 488	---AACCTACTTGTTCAGAGGTGAGGCGGAAAGCGGTACG	GGCTGAAACAAACCTACCCAT			536
Query 963	CTAAGGTTTTGACCTCAGATCAGACAAGGATA	CCCGCTGAACTTAAGCATATCAA			1016
Sbjct 537	CTAAGGTTTTGACCTCAGATCAGACAAGGATA	CCCGCTGAACTTAAGCATATCAA			598

# Appendix

Appendix (5) *Clonostachys rosea* strain CP2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KR183785.1 >16\_ITS4

```
AAAGGGAAGTACTAGGACTCTTCCTGATCTGAGGTCACCTTAGAAA  
GTTGGGGGTTTAAACGGCAGGGGCTCATCGCTCTCCGATGCGGA  
ATATCACTACTTCGCAGAGGAGGCCACGACGGGTCCGCCACTA  
GATTTAGGGGCGGCCCTCCCTCGCGGGCTTTGGCCGATCCCC  
AACACCACGCCCTAGGGGCATGAGGGTTGAAATGACGCTCAG  
ACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGGCGCAATGTGCGTTC  
AAAGATTCGATGATTCCTGAATTCTGCAATTCACATTACTTAT  
CGCATTTTCGCTGCGTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATC  
CGTTGTTGAAAGTTTTTATTTATTTGTAAAACTACTCAGAAGA  
TTCCAAAATAAAACAAGAGTTAAGTTTCCTAGGCGGGGCGCCTG  
ATCCGGGGCACACGAGGCGCCCGGGGCAATCCCGCCGAAGCA  
ACAGTAGGTATGTTACATGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGT  
AATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGAC  
TTTTACTTCCAAGAGGGTGTAAATGTGCACAC
```





>16\_ITS4

CTGAGGTCACCTTAGAAAGTTGGGGGTTTAACGGCAGGGGCTC  
 ATCGCTCTCCGATGCGGAATATCACTACTTCGCAGAGGAGGCC  
 ACGACGGGTCCGCCACTAGATTTAGGGGCCGGCCCTCCCTCGC  
 GGGCTTTGGCCGATCCCCAACACCACGCCCTAGGGGCATGAGG  
 GTTCAAATGACGCTCAGACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGC  
 GGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCT  
 GCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCATTCGAT  
 GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTATTTATTTGT  
 AAAAATACTCAGAAGATTCCAAAATAAAACAAGAGTTAAGT  
 TTCCTAGGCGGGCGCCTGATCCGGGGCACACGAGGCGCCCGG  
 GGCAATCCCGCCGAAGCAACAGTAGGTATGTTACATGGGTTT  
 GGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAA  
 CGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCAAGA

*Clonostachys rosea* strain CP2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence  
 Sequence ID: KR183785.1 Length: 573 Number of Matches: 1  
 Range 1: 20 to 563

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1000 bits(541)	0.0()	543/544(99%)	0/544(0%)	Plus/Minus	
Features:					
Query 1	CTGAGGTACCTTAGAAAGTTGGGGTTTAA	CGGAGGGGCTCATCGCTCTCCGATGCGG	58		
Sbjct 563	CTGAGGTACCTTAGAAAGTTGGGGTTTAA	CGGAGGGGCTCATCGCTCTCCGATGCGG	584		
Query 61	AATATCACTACTTCGCAGAGGAGGCCACGACGGGTCGGCCACTAGATTAGGGGCCGGCC	128			
Sbjct 583	AATATCACTACTTCGCAGAGGAGGCCACGACGGGTCGGCCACTAGATTAGGGGCCGGCC	444			
Query 121	CTCCCTCGCGGGCTTTGGCCGATCCCCAACCCACGCCCTAGGGGCATGAGGGTTGAAAT	188			
Sbjct 443	CTCCCTCGCGGGCTTTGGCCGATCCCCAACCCACGCCCTAGGGGCATGAGGGTTGAAAT	384			
Query 181	GACGCTCAGACAGGCATGCCCGCCAGAACTAGGCGGGCGCAATGTGCGTCAAAGATT	248			
Sbjct 383	GACGCTCAGACAGGCATGCCCGCCAGAACTAGGCGGGCGCAATGTGCGTCAAAGATT	324			
Query 241	GATGATCACTGAAATTCGCATTCACATTAATCGCAATTCGCTGCGTCTTCATCG	308			
Sbjct 323	GATGATCACTGAAATTCGCATTCACATTAATCGCAATTCGCTGCGTCTTCATCG	264			
Query 301	ATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTATTTAATGTAAAACTACTCAG	368			
Sbjct 263	ATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTATTTAATGTAAAACTACTCAG	284			
Query 361	AGATTCCAAAATAAAACAAGAGTTAAGTTTCTAGGCGGGCGCCTGATCCGGGGCACACG	428			
Sbjct 203	AGATTCCAAAATAAAACAAGAGTTAAGTTTCTAGGCGGGCGCCTGATCCGGGGCACACG	144			
Query 421	AGGCGCCCGGGCAATCCCGCGAAGCAACAGTAGGATGTTCACATGGGTTGGGAGTT	488			
Sbjct 143	AGGCGCCCGGGCAATCCCGCGAAGCAACAGTAGGATGTTCACATGGGTTGGGAGTT	84			
Query 481	GTAAACTCGGTAAATGATCCCTCCGCTGGTCAACCAACGGAGACCTTGTACGACTTTAC	548			
Sbjct 83	GTAAACTCGGTAAATGATCCCTCCGCTGGTCAACCAACGGAGACCTTGTACGACTTTAC	24			
Query 541	TTCC	544			
Sbjct 23	TTCC	28			

Appendix (6) *Orbiliaceae* sp. strain SA228 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KX953548.1

>17\_ITS1

AAGTGCCTCGGAGTGGATCACTTTTTCTACCTGCTCAGTGGC  
 CCTTGGGTCACCGGACCGGTCAACCCTTTGTGAACCAAAAAC  
 CTTTTTCGCTTCGGCAGCTGGGCCCCGACCCGGCCCGTCAGCCT  
 GCCGTTAGCACCCAACCGAAAAACCTGTTGTCAAACATATGT  
 CTGATAACCAAAATTTTCGAATGAAAATCAAACCTTTCAACAA  
 CGGATCTCTTGGTTCCCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACG  
 CGATAGTTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTC  
 TTTGAACGCACATTGCGCCCATTGGTATTCCTTTGGGCATGTCT  
 GTTTGAGCGTCATTACAACCCCTCAGCTAACGCTGGTTTTGAA  
 CCGGGACAGGTTTGTTCACACACCCGCACCGGTTTTAAAGT  
 TGTAAGCTCTGCTGGCTGCTCTGCCCAACCGGAACATAGTAA  
 AAAAAAACTACTTGTTCAGAGGTGAGGCGGAAAGCGGTACG  
 GCCTGAACAAAACCTACCCATCTAAGGTTTGACCTCAGATCAG



# Appendix

ACAAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG  
AAAAAAGGATCATTACAAAAGAGTGAGAAATACTTTTTCCTCC  
TGCTCAT



>17\_ITS4

GAAGCCTAGGATCCTTGTCTGATCTGAGGTCAAACCTTAGATG  
GGTAGGTTTTGTTTCAGGCCGTACCGCTTTCCGCCTCACCTCTGA  
ACAAGTAGTTTTTTTTTTACTATGTTCCGGTTGGGGCAGAGCAG  
CCAGCAGAGCTTACAACCTTTAAAACCGGTGCGGGTGTGTGAAA  
ACAAACCTGTCCCGGTTCAAACACAGCGTTAGCTGAGGGGTTG  
TAATGACGCTCAAACAGACATGCCCAAAGGAATACCAATGGG  
CGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCA  
ATTCACATTA ACTATCGCGTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCG  
GGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTTCATTCGA  
AAATTTTGGTTATCAGACATATGTTTTGACAACAGGTTTTTTCGG  
TTGGGTGCTAACGGCAGGCTGACGGGCCGGGTTCGGGGCCAG  
CTGCCGAAGCGAAAAAGGTTTTTTGGTTCACAAAGGGTTGACC  
GGTCCGGTGACCAAGGGCCACTGAGCAGGTAGGAAAAGTG  
ATTTCTCACTCTTTTGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTAC  
GGAAGGATCATTACAAAAGAGTGAGAAATCACTTTTTCCTAC  
CTGCTCAGTGGCCCTTGGGTACGGGACGGGTCAACCCTTTGT  
GAACCAAAAAACCTTTTTTCGCTTCGGCGGCTGGGCCCCGACCG

# Appendix

GGTTAGCCCGCCTGAAGATAGTTCTCAACAGAAAAACCTGTTG  
ACAAAACCTTATGTCTGATAACCAAATTTTCAAATGAAAATCA  
AATCTTTCACCAACGGAACCCTTAGCTCCCGCCTCGATGTAGT  
ATGTAGCGAAAACGCGACAGTTATTGTGAATTGCAGGATTTAG  
TGACCAATCGAGTTTTTTGAACGCCCAATGGCGCCCATTGGATA  
TCCCTTTGCGCCATGTCATGTTTGAAGCGTCATTTACAACCCCT  
CAGCTAAAGGCTGATTCTTTAACCTGGAACAGGTTTAGTTTTCC  
ACCCCCCGGCCCGGTTTTTAAAGTTTAAAGCCCCGGCTGGC  
TAG



>17 ITS1

CTTTTTCCTACCTGCTCAGTGGCCCTTGGGTCACCGGACCGGTC  
AACCTTTTGTGAACCAAAAAACCTTTTTTCGCTTCGGCAGCTGG  
GCCCCGACCCGGCCCGTCAGCCTGCCGTTAGCACCCAACCGAA  
AACCTGTTGTCAAACATATGTCTGATAACCAAATTTTTCGA  
ATGAAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCCGCA  
TCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATAGTTAATGTGAATTG  
CAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCC  
CATTGGTATTCCTTTGGGCATGTCTGTTTGAAGCGTCATTACAAC  
CCCTCAGCTAACGCTGGTTTTTGAACCGGGACAGGTTTGTTTTCA  
CACACCCGCACCGGTTTTTAAAGTTGTAAGCTCTGCTGGCTGCT



 *Appendix* 

---

CTGCCCAACCGGAACATAGTAAAAAAAACACTACTTGTTTCAG  
AGGTGAGGCGGAAAGCGGTACGGCCTGAACAAAACCTACCCA  
TCTAAGGTTTGACCTCAGATCAGACAAGGATACCCGCTGAACT  
TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAAGGATCATTACAAAA  
GAGTGAGAAATACTTTTTCTCCTGCTC

>17\_ITS4

CTGATCTGAGGTCAAACCTTAGATGGGTAGGTTTTGTTCAGGC  
CGTACCGCTTTCCGCCTCACCTCTGAACAAGTAGTTTTTTTTT  
ACTATGTTCCGGTTGGGGCAGAGCAGCCAGCAGAGCTTACAAC  
TTTAAAACCGGTGCGGGTGTGTGAAAACAAACCTGTCCCGGT  
CAAACAGCGTTAGCTGAGGGGTTGTAATGACGCTCAAACA  
GACATGCCCAAAGGAATACCAATGGGCGCAATGTGCGTTCAA  
AGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTA ACTATC  
GCGTTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCGGGAACCAAGAGATCC  
GTTGTTGAAAGTTTTGATTTTCATTCGAAAATTTTGGTTATCAG  
ACATATGTTTTGACAACAGGTTTTTCGGTTGGGTGCTAACGGC  
AGGCTGACGGGCCGGGTTCGGGGCCCAGCTGCCGAAGCGAAAA  
AGGTTTTTTGGTTCACAAAGGGTTGACCGGTCCGGTGACCCAA  
GGGCCACTGAGCAGGTAGGAAAAAGTGATTTCTCACTCTTTTG  
GTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAGGATCATTACC  
AAAAGAGTGAGAAATCACTTTTTCTACCTGCTCAGTGGCCCT  
TGGGTCACGGGACGGGTCAACCCTTTGTGAACCAAAAAACCTT  
TTTCGCTTCGGCGGCTGGGCCCCCGACCGGG

# Appendix

Orbiliaceae sp. strain SA228 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: **KX953548.1** Length: 590 Number of Matches: 2  
Range 1: 1 to 590

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1050 bits(568)	0.0()	584/591(99%)	4/591(0%)	Plus/Plus	

Features:

```

Query 162 AAAGAGTGAGAAATCACTTTTTCCTACCTGCTCAGTGG-CCCTTGGGTCACCGGACCGGT 228
Sbjct 1 AAAGAGTGAGAAATCACTTTTTCCTACCTGCTCGGTGSCCCCTTGGGTCACCGGACCGGT 68
Query 221 CAACCCCTTTGTGAACCAAAAAACCTTTTTCGCTTCGGCAGCTGGGCCCCGACCCGGCCCG 288
Sbjct 61 CAACCCCTTTGTGAACCAAAAAACCTTTTTCGCTTCGGCAGCTGGGCCCCGACCCGGCCCG 128
Query 281 TCAGCCTGCGGTTAGCACCCCAACCGAAAAACCTGTTGTCAAAACATATGTCTGATAACCA 348
Sbjct 121 TCAGCCTGCGGTTAGCACCCCAACCGAAAAACCTGTTGTCAAAACATATGTCTGATAACCA 188
Query 341 AAAATTCGAATGAAAATCAAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTCCCGCATCGATGA 408
Sbjct 181 AAAATTCGAATGAAAATCAAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTCCCGCATCGATGA 248
Query 401 AGAACGCAGCGAAACGCGATAGTTAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAGTCT 468
Sbjct 241 AGAACGCAGCGAAACGCGATAGTTAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAGTCT 308
Query 461 TTGAACGCACATTGCGCCCATTTGGTATTCCCTTGGGCATGCTGTGTGAGCGTCATTACA 528
Sbjct 301 TTGAACGCACATTGCGCCCATTTGGTATTCCCTTGGGCATGCTGTGTGAGCGTCATTACA 368
Query 521 ACCCTTCAGCTAACGCTGGTTGAACCGGGACAGGTTGTTTCAACAC-CC-GCACC 578
Sbjct 361 ACCCTTCAGCTAACGCTGGTTGAACCGGGACAGGTTGTTTCAACACACCTGCACC 428
Query 579 GGTAAAGTGTAAAGCTCTGCTGGCTGCTCTGCCCAACCGGAACATAGTAAAAAAA 638
Sbjct 421 GGTAAAGTGTAAAGCTCTGCTGGCTGCTCTGCCCAACCGGAACATAGTAAAAAAC- 479
Query 639 aaCTACTTGTTCAGAGGTGAGGCGGAAAGCGGTACGGCTGAACAAAACTACCCATCTA 698
Sbjct 488 AACTACTTGTTCAGAGGTGAGGCGGAAAGCGGTACGGCTGAACAAAACTACCCATCTA 539
Query 699 AGGTTTGACCTCAGATCAGACAAGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAA 749
Sbjct 548 AGGTTTGACCTCAGATCAGACAAGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAA 598

```

Appendix (7) Orbiliaceae sp. strain SA228 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KX953548.1

>20\_ITS1

```

GGGTTTCGGGGAGTGAGAATCACTTTTTCCTACCTGCTCGGTG
GCCCTTGGGTCACCGGACCGGTCAACCCTTTGTGAACCAAAAA
ACCTTTTTCGCTTCGGCAGCTGGGCCCCGACCCGGCCCGTCA
CCTGCCGTTAGCACCCAACCGAAAAACCTGTTGTCAAAACATA
TGTCTGATAACCAAAATTTTTCGAATGAAAATCAAACTTTCAA
CAACGGATCTCTTGGTTCCCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ACGCGATAGTTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
GTCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTTGGTATTCCCTTGGGCATG
TCTGTTTGAGCGTCATTACAACCCCTCAGCTAACGCTGGTTTTG
AACCGGGACAGGTTTGTTTTCAACACACCCGCACCGGTTTTAAA
GTTGTAAGCTCTGCTGGCTGCTCTGCCCAACCGGAACATAGT
AAAATAAAAAAAACTACTTGTTCAGAGGTGAGGCGGAAAGCG
GTACGGCCTGAACAAAACCTACCCATCTAAGGTTTGACCTCGA
ATCAGACAAGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAAAAACCC

```

GAAGGAAATTGTGGGTTTCGGGAAAAACATCCAAAATAATCA  
TAAAAT



>20\_ITS4

CATGCAGGTA CT CGTTAAATCTGAGGTCAACCTTAGATGGGTA  
GGTTTTGTT CAGGCCGTACCGCTTTCGCCTCACCTCTGAACAA  
GTAGTTTTTTTATTTTACTATGTTCCGGTTGGGGCAGAGCAGC  
CAGCAGAGCTTACA ACTTTAAAACCGGTGCGGGTGTGTGAAAA  
CAAACCTGTCCCGGTTCAA AACAGCGTTAGCTGAGGGGTTGT  
AATGACGCTCAAACAGACATGCCCAAAGGAATACCAATGGGC  
GCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTC ACTGAATTCTGCAA  
TTCACATTA ACTATCGCGTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGG  
GAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTTCATTCGAA  
AATTTTGGTTATCAGACATATGTTTTGACAACAGGTTTTTCGGT  
TGGGTGCTAACGGCAGGCTGACGGGCCGGGTCGGGGCCCAGC  
TGCCGAAGCGAAAAAGGTTTTTTGGTTCACAAAGGGTTGACCG  
GTCCGGTGACCAAGGGCCACCGAGCAGGTAGGAAAAAGTGA  
TTTCTACTCTTTTGGTAATGATCCTTCAGCAGGTTACCTACG  
GAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCCAAAAATGGGGGGG



>20\_ITS1

CACTTTTTCCTACCTGCTCGGTGGCCCTTGGGTCACCGGACCGG  
TCAACCCTTTGTGAACCAAAAACCTTTTTCGCTTCGGCAGCTG  
GGCCCCGACCCGGCCCGTCAGCCTGCCGTTAGCACCAACCGA  
AAAACCTGTTGTCAAACATATGTCTGATAACCAAAATTTTCG  
AATGAAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCCGC  
ATCGATGAAGAACGCAGCGAACGCGATAGTTAATGTGAATT  
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGC  
CCATTGGTATTCCTTTGGGCATGTCTGTTTGAGCGTCATTACAA  
CCCCTCAGCTAACGCTGGTTTTGAACCGGGACAGGTTTGTTTTC  
ACACACCCGCACCGGTTTTAAAGTTGTAAGCTCTGCTGGCTGC  
TCTGCCCAACCGGAACATAGTAAAATAAAAAAACTACTTGT  
TCAGAGGTGAGGCGGAAAGCGGTACGGCCTGAACAAAACCTA  
CCCATCTAAGGTTTGACCTCGAATCAGACAAGGATACCCGCTG  
AACTTAAGCATATCA

>20\_ITS4

TGAGGTCAACCTTAGATGGGTAGGTTTTGTTCAGGCCGTACCG  
CTTCCGCCTCACCTCTGAACAAGTAGTTTTTTTTTATTTTACTAT  
GTTCCGGTTGGGGCAGAGCAGCCAGCAGAGCTTACAACCTTAA  
AACCGGTGCGGGTGTGTGAAAACAAACCTGTCCCGGTTCAAAA

# Appendix

CCAGCGTTAGCTGAGGGGTTGTAATGACGCTCAAACAGACATG  
 CCCAAAGGAATACCAATGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTC  
 GATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTA ACTATCGCGTTTC  
 GCTGCGTTCTTCATCGATGCGGGAACCAAGAGATCCGTTGTTG  
 AAAGTTTTGATTTTCATTTCGAAAATTTTGGTTATCAGACATATG  
 TTTTGACAACAGGTTTTTTCGGTTGGGTGCTAACGGCAGGCTGA  
 CGGGCCGGGTCGGGGCCAGCTGCCGAAGCGAAAAAGGTTTT  
 TTGGTTCACAAAGGGTTGACCGGTCCGGTGACCCAAGGGCCAC  
 CGAGCAGGTAGGAAAAAGTGATTTCTCACTCTTTTGGTAATGA  
 TCCTTCAGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTAC  
 TTCC

Orbiliaceae sp. strain SA228 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: **KX953548.1** Length: 590 Number of Matches: 1  
 Range 1: 1 to 589

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1027 bits(506)	0.0()	582/593(98%)	7/593(1%)	Plus/Plus	
Features:					
Query	58	AAAGAGTGAAGAAATCAC	TTTTTCTACTGCTCGGTGG	CCCTGGGTCAACGGACCGGT	116
Sbjct	1	AAAGAGTGAAGAAATCAC	TTTTTCTACTGCTCGGTGG	CCCTGGGTCAACGGACCGGT	68
Query	117	CACCCCTTGTGAACCAAAAAAC	TTTTTCGCTTCGGCAGCTGGG	CCCCCGACCCGGCCCCG	176
Sbjct	61	CACCCCTTGTGAACCAAAAAAC	TTTTTCGCTTCGGCAGCTGGG	CCCCCGACCCGGCCCCG	128
Query	177	TCAGCCTGCCGTAGCACCCCAACC	GAAAAACCTGTGTCAAAACATAT	GCTCTGATACCA	236
Sbjct	121	TCAGCCTGCCGTAGCACCCCAACC	GAAAAACCTGTGTCAAAACATAT	GCTCTGATACCA	188
Query	237	AAAATTCGAATGAAATCAAAAC	TTTTCAACACGGATCTCTGGT	CCCCGCATCGATGA	296
Sbjct	181	AAAATTCGAATGAAATCAAAAC	TTTTCAACACGGATCTCTGGT	CCCCGCATCGATGA	240
Query	297	AGAACGCACCGAAACCGATAGT	TAAATGTGAATTCAGAAATCAGT	GAATCATCGAGTCT	356
Sbjct	241	AGAACGCACCGAAACCGATAGT	TAAATGTGAATTCAGAAATCAGT	GAATCATCGAGTCT	388
Query	357	TTGACGCACATTCGCCCCATTGGT	ATTCCTTGGGCATGCTGT	TGAGCCTCATTACA	416
Sbjct	381	TTGACGCACATTCGCCCCATTGGT	ATTCCTTGGGCATGCTGT	TGAGCCTCATTACA	368
Query	417	ACCCCTCAGCTAACGCTGGTTTT	GAAACGGGACAGGTTTGT	TTCAACAC-CC-GCAC	474
Sbjct	361	ACCCCTCAGCTAACGCTGGTTTT	GAAACGGGACAGGTTTGT	TTCAACACACCTGCACC	428
Query	475	GGTTTTAAAGTTGTAAAGCTCTG	CTGGCTGCTCTGCCCAACCGG	AACATAGTAAAAAT	534
Sbjct	421	GGTTTTAAAGTTGTAAAGCTCTG	CTGGCTGCTCTGCCCAACCGG	AACATAGTAAAAAAC	479
Query	535	AAATCTACTTGTTCAGAGGTGAGG	CGGAAGCGGTACGGCTGAAAC	AAAACCTACCCAT	594
Sbjct	488	---AACTACTTGTTCAGAGGTGAGG	CGGAAGCGGTACGGCTGAAAC	AAAACCTACCCAT	536
Query	595	CTAAGGTTTGACCTCSAATCAGACA	AGGATACCCGCTGAAC	TAAACATATCA	647
Sbjct	537	CTAAGGTTTGACCTCAGATCAGACA	AGGATACCCGCTGAAC	TAAACATATCA	589

## Abstract

This study was conducted in the laboratory of fungi-biology department-science collage- Misan university, where collected 90 soil samples from different areas of Misan Governorate at different intervals from January 2018 to July 2018. Samples were collected from orchards and agricultural fields, where isolated 12 species of nematode trapping fungi, where fungi were recorded *Clonostachys rosea*, *Arthrobotrys microscaphoides*, *Arthrobotrys cookedickinson* and *Arthrobotrys rutgeriense* were recorded for the first time in Iraq.

The results of contrast test between *T.harzianum* and *T.viride* and Nematode trapping fungi in the CMA and PDA showed that all the studied fungi were found to be antagonistic but did not inhibit each other. *T.harzianum* and *T.viride* achieved a degree of antagonism 1, 2, 3.

Results showed that the two fungi filtrates of *T.harzianum*, *T.viride*, 10, 20% and 30% increased the growth of nematode trapping fungi in the media CMA. The results showed that the highest effect on the growth of *A.thaumasia* 85.7 mm, while the lowest effect of *C.rosea* with growth rate 77.4 mm, The effect of *T.viride* was on the fungi of the tested nematode trapping fungi. The highest effect on the growth of *A.cookedickison* was higher than that of the other fungus with 85.7 mm, while the lowest effect of *A.eudermata* with a growth rate of 78.2 mm. The results showed that the concentrations of 10% and 20% are the best in growth. The results of the study showed that the effect of *T.harzianum* fungi on the growth of the tested nematode trapping fungi was higher than the effect of *T.viride*. Where the concentration showed 30% the highest number of conidies and the concentration was 20% and 10%.

Results showed that the *Pseudomonas fluorescens* filtrate (10, 20 and 30%) increased the growth of nematode trapping fungi in the CMA. The

## Abstract

---

highest effect on the growth of the fungus was *Clonostachys rosea* compared with the rest of the fungus with 87.0 mm, the lowest effect of *A.thaumasia* with a growth rate 83.8 mm, It was noticed that the number of conidia increased with increasing concentrations, where the concentration showed 30% the highest number of conidia where it reached 5382.0 conidia/cm<sup>2</sup> and the concentration was 20% where it reached 4453.3conidia/cm<sup>2</sup> and 10% where it reached 3518.7 conidia/cm<sup>2</sup>.

DNA was extracted from the studied nematode trapping fungi, the molecular diagnosis was performed using the ITS1 and ITS4 regions, the bands appeared at 500bp, the genetic tree worked of the studied nematode trapping fungi and the sequence of amino acids using a program (MEGA).

All of studied nematode trapping fungi showed the ability to produce the nanoparticles through the color change of the filter of the fungus to brown, the nature of these nanoparticles was determined using a Scanning Electron Microscope.

A mixture of *T.harzianum*, *P. fluorescens* and Nematode trapping fungus gives the lowest rate of hatching eggs in the case of *C.rosea*, where it was 26.85 % and the highest rate of hatching eggs in when use only *T.viride* filtrate where it was 66.21%. The highest rate of second stage larvae death when use mixture of *T.viride* and *P. fluorescens* and *A.conoides* where it was 75.46 % and the lowest rate of second stage larvae death in when use only *A.conoides* filtrate where it was 34.72 %.

Republic of Iraq  
Ministry of Higher Education  
and Scientific Research  
University of Misan  
College Of Science



# **Isolation and identification of Nematode Trapping Fungi and their effect in egg and larva of Root Knot Nematode (*Meloidogyne sp.*) and antagonistic ability with some bio agents**

A Thesis

Submitted to the council of College of Sciences/ University of Misan

In partial/ Fulfillment of the Requirements For the Degree

Master of Science in Biology

By

**Anfal Abdulrazzaq Lafta**

B.Sc. Biology

2015

Supervised by

**Prof. Dr. Ali A. Kasim**

2019 A.D

1440 A.H