وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.

جامعة ميسان – كلية التربية الاساسية.

قسم العلوم العامة – علوم الحياة.

زيادة قابلية فطر *Trichoderma harzianum* على مقاومة المضاد الفطري *Benomyl* باستخدام المطفر الكيميائي - NTG .

بحث مقدم إلى رئاسة قسم العلوم العامة – هي جزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في تخصص علوم الحياة .

تقدم بهِ الطالبات :

مريم علي عبد ادعير هدير عبد اليمة حلو حنش

نور الهدى علي شريف .

بأشراف :

د. وسن جعفر إبراهيم .

ايار ٢٠٢٣م جماد الاول ١٤٤٤هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيم

﴿ اقْرَأْ بِاسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ (١) خَلَقَ الْإِنْسَانَ مِنْ عَلَقٍ (٢) اقْرَأْ وَرَبُّكَ الْأَكْرَمُ (٣) الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ (٤) عَلَّمَ الْإِنْسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ (٥) ﴾ .

صدق الله العلي العظيم.

«سورة العلق: الآيات 1-5»

أهداء...

بسم الله الرحمن الرحيم (ولا تنسوا الفضل بينكم أن الله بما تعملون بصير)

صدق الله العلي العظيم.

وصلت رحلتنا الجامعية الى نهايتها بعد تعب ومشقة .

وها نحن نختم بحث تخرجنا بكل همة ونشاط .

وأمتناننا لكل من كان له فضل في مسيرتنا وساعدنا ولو باليسير نحمد الله تعالى حمدا كثيرا طيبا مباركا ملئ السموات والارض على ما أكرمنا بأتمام هذه الدراسة التي نرجو ان تنال رضاه سبحانه وتعالى...

الى من علمنا ان الدنيا كفاح ... وسلاحها العلم والمعرفة

إلى نبراس الأمل وملهم الصبر مولانا الحاضر الغائب صاحب العصر والزمان (عجل الله فرجه)

إلى من كللهم الله بالهيبة َوالوقار وحملنا اسمائهم بكل افتخار (آباءنا الطيبين)

إلى فخرنا والنبع الذي نرتوي منه حبا ً وحنانا (أمهاتنا الغاليات)

إلى أصدقاء الدرب وهدية َالسماء

إلى كل من علمنا حرفا : أساتذتنا إلى جامعتنا العزيزة

إلى كل من تمنا لنا النجاح والموفقيه.

نهدي هذا الجهد المتواضع لكم.

شكر و تقدير ...

قال تعالى (ومن يشكر فإنما يشكر لنفسه) لقمان الآية ١٢.

نشكر الله الذي الهمنا الطموح وسدد خطانا لأنجاز هذا العمل

كما نتوجه بخالص الشكر الى كافة أساتذتنا الكرام بقسم العلوم العامة. ونتقدم بجزيل الشكر

والعرفان الى الدكتورة

وسن جعفر إبراهيم

التي أشرفت على هذا العمل ولم تبخل علينا بجهد أو نصيحه

وعلى توجيهها وملاحظاتها لنا للسير في العمل الصحيح وكذلك على صبرها طيلة السنة

الدراسية رغم تعدد التزاماتها.

وعرفانا بالجميل نقدم شكرنا إلى كل من كان له الفضل في توجيهنا لإتمام هذا البحث

لهم منا جميعاً جزيل الشكر والعرفان .

الخلاصة ..

عوملت كونيديا العزلة البرية للفطر *Trichoderma harzianum* (Th-wt) بالمطفر الكيمياوي نتروزو كوانيدين (NTG) N-Methyl – N - nitro – N - nitrosoguanidine . بتركيز 0.06%. الكونيديا المقاومة للتأثير المميت للNTG عوملت مرة ثانية بنفس المادة وبنفس التركيز عزلت ست سلالات مطفرة من المعاملة الأولى و ثلاث سلالات مطفرة من المعاملة الثانية مقاومة للمضاد الفطري Benomyl بتركيز (1000-250) µg\ml . كانت السلالات المطفرة (Th-1-6,Th-1-4,Th-2-1) ذات تأثير يفوق تأثير العزلة البرية في المقاومة الحياتية لنمو الفطر الممرض R.solani .

قائمة المحتويات .

الفصول والمحتوى	التسلسل	رقم الصفحة
اية من القران الكريم	I	
الاهداء	Ii	
الشكر والتقدير	Iii	
الخلاصة	Iv	1
قائمة المحتويات	Ivi	2
الفصل الأول		4
المقدمة	1	5
الفصل الثاني		7
الفطريات	1-1	8
Trichoderma harzianum	2-1	8
فوائد الفطر *Trichoderma harzianum*	1-2-1	8
المكافحة الحيوية	3-1	10
طرق المقاومة الحياتية	1-3-1	10
الاستيراد	1-1-3-1	10
الاكثار	2-1-3-1	10
الصيانة او المحافظة	3-1-3-1	10
تطبيقات التكنولوجيا الحيوية	2-3-1	11
الطفرات الوراثية	4-1	12

تقسم الطفرات حسب مكان حدوثها	1-4-1	12
تقسم الطفرات حسب المؤثر	2-4-1	12
الفصل الثالث		13
المواد وطرائق العمل	2	14
المعاملة بالمطفر الكيمياوي NTG	1-2	14
الكشف عن قابلية تحمل الفطر Th-wt والفطريات المتحصل عليها من عملية التطفير لتراكيز مختلفة من المضاد الفطري Benomyl	2-2	14
تأثير الفطر Th-wt والسلالات المطفرة على قابلية الفطر *Rhizoctonia solani* على النمو	3-2	15
قدرة كونيديا الفطر Th-wt وبعض السلالات المطفرة على البقاء في التربة	4-2	15
الفصل الرابع		16
النتائج والمناقشة	3	17
تأثير الفطر Th-wt والسلالات المطفرة على قابلية الفطر *R.solani*	1-3	17
قدرة كونيديا الفطر Th-wt وبعض السلالات المطفرة على البقاء في التربة	2-3	18
المصادر	4	23

الفصل الأول

المقدمة

1-المقدمة Introduction

بسبب الأضرار الجسيمة التي سببتها الكائنات المجهرية الممرضة وغيرها من الكائنات الحية الاخرى في الحقول الزراعية والتي كلفت مليارات الدولارات سنوياً لذا اقدمت البلدان على استخدام المبيدات الكيميائيه للقضاء على هذه الممرضات لكن مكافحة الكائنات الممرضه بمواد كيميائية اصطناعية أدت إلى مشاكل عديدة للكائنات الحية التي تقطن التربة والتي أثرت على ديدان الأرض والعناكب أضافة إلى النباتات وهذا بدوره أثر على التنوع الحيوي فضلا عن تأثيراتها السامة على الحياة البرية مثل الطيور والحشرات المفيدة مثل نحل العسل وأضرارها للإنسان والحيوانات الأليفة مما أدى إلى البحث عن حل أقل تهديداً للبيئة وصحة الإنسان وفعال لمعالجة مشاكل هذه الكائنات الممرضه (عزيز، محمد، ياسين ، 2021)

ونتيجة لذلك اهتم المختصون بعلم المكافحة الحيوية التي لا ضرر منها للمحاصيل أو الإنسان أو حيواناته، وهي رخيصة الثمن لا تحتاج إلى آلات معقدة أو مواد خاصة، وسهلة التطبيق زراعياً ودائمة المفعول لأنها تعتمد على مفاهيم البيئة. ومن أهم مبادئها العمل على تغيير المستوى المتوازن لكثافة أي حشرة لتصبح أقل من المستوى الاقتصادي للضرر. ومن مزايا المكافحة الحيوية عدم استطاعة الآفة أن تطوّر مناعتها ضد الأعداء الحيوية، وبإمكان العدو الحيوي البحث عن فصيلة نباتية في الطبيعة وانتشاره وزيادة عدده عليها من دون تدخل الإنسان لأنه متوفر أصلاً في الطبيعة. ومن الكائنات التي استعملت في السيطرة الحيوية الفيروسات والبكتيريا والطفيليات والفطريات ومنها فطر *Trichoderma harzianum* وذلك بسبب سهولة عزله وسرعة تكاثره وعدم احتياجه إلى متطلبات غذائية خاصة وتأثيره الايجابي في نمو الكثير من النباتات فضلا عن تأثيره التثبيطي للكثير من المسببات المرضية للنبات. (المعارج وصالح ، 2016).

أحد النتائج المشجعه على استخدام فطر *Trichoderma harzianum* كأحد عوامل المكافحة الحيويه هو قدرتهُ على تقليل تأثير الفطر الممرض R.solani المسبب الرئيسي لمرض تعفن الجذور في شتلات التبغ حيث يستخدم فطر *Trichoderma harzianum* للحماية الوقائية من العديد من الفطريات المسببة للأمراض في التربة. وبدأ في ظروف معملية وتم تقدير تأثير الاختزال القوي على فطر *R.solani* . (Biljana Giveroska, 2011).

ولتحسين كفاءة الأحياء المجهرية ومنها الفطريات المعتمدة في برنامج المقاومة الحياتية وزيادة مقاومتها للمضادات الفطرية منها المضاد الفطري Benomyl ولتكون وسيلة هامة للقضاء على الكائنات الضاره الاخرى لذا لجأت العديد من البحوث إلى دراسة إمكانية زيادة وتحسين إنتاج الفطريات للعديد من المركبات المهمة مثل الإنزيمات المحللة والهرمونات وأن مثل هذه الزيادة يمكن الوصول أليها عن طريق التطفير Mutation والذي ممكن أن يؤدي إلى إحداث تغير في المادة الوراثية والنيوكليوتيدات على شريط DNA ،وقد تحدث الطفرة بصورة طبيعية وتعرف بالتلقائية أو طفرات مستحثة بفعل عوامل فيزيائية أو كيميائية (عباس، حميد ، 2006).

حيث تم استخدام المطفر الكيماوي NTG على عزلة برية من فطر *Trichoderma harzianum* لأحداث طفرات مقاومة للمضاد الفطري وبذلك تم الحصول على عزلات مقاومة للمضاد Benomyl حيث تم عزل 6 سلالات مطفرة من المعاملة الأولى وعنده معاملة الكونيديا المقاومة للتأثير المميت لل NTG بنفس

المادة وبنفس التركيز عزلت 3 سلالات مطفرة كما لاحظ ان السلالات المطفرة كانت لها مقاومة متباينة للمضاد الفطري وهذا يدل ان هذه الطفرات لم تكن موجودة في الطبيعة وأنما استحثت نتيجة للمعاملة بالمطفر الكيماوي . (papavizas et al, 1981).

وقد تم الاستنتاج انه لا توجد هنالك علاقة بين تحمل تراكيز عالية من المضاد الفطري وقدرة السلالات المطفرة على افراز مواد مضادة لنمو الفطر الممرض والسبب في ذلك يعود الى أن تأثير العوامل المطفرة سواء كانت الفيزياوية أو الكيمياوية قد يكون في أكثر من موقع على جزيئة المادة الوراثية DNA وقد يكون التشفير في هذه المواقع ذات معنى وبالتالي نلاحظ حصول اختلاف في صفة او صفتين للنمط الوراثي الجديد genotype (هير سكوفيتس1983).

وقد حصل (.Papavizas et. al,1982) على (19) مستعمرة من الفطر *Trichoderma harzianum* لها القابلية على مقاومة المضاد الفطري benomyl بتركيز (100-500) µg\ml وذلك بمعاملة العزلة البرية بالأشعة فوق البنفسجية uv-light . كما استطاع (.Katan et al, 1984) من الجمع بين تأثير المطفرات الفيزياوية والكيماوية للحصول على سلالتين من الفطر Talaromyces flavas ذات مقاومة عالية للمضاد الفطري benomyl . كما أكد (Ibraheem,1998) ان اعادة المعاملة بالـ NTG ساعد على انتخاب عزلات ذات انتاجية عالية للأنزيم المخثر للحليب من الفطر *Trichoderma hamatum* .

و تمت دراسة قدرة بعض السلالات المطفرة المنتخبة على البقاء حية في التربة المدعمة بالمضاد الفطري وكانت اقل السلالات قدرة على إعادة الانبات وتكوين المستعمرات هي Th- 2- 3.

هدف الدراسة الحالية هي زيادة مقاومة عزله بريه من فطر *Trichoderma harzianum* لتراكيز عالية من المضاد الفطري Benomyl باستخدام المطفر الكيماوي NTG وكذلك اختبار قابلية السلالات المطفرة على مقاومة نمو ونشاط الفطر *Rhizoctonia solani* وكذلك دراسة قدرتها على البقاء حيه في التربة.

الفصل الثاني

مراجعة المصادر

1-1 الفطريات : كائنات حية معقدة تخلو من الصبغة الخضراء (الكلوروفيل) بكون الفطريات لا تحتوي على اليخضور فأنها تعتمد في غذائها على الكائنات الأخرى والبيئة حيث تتغذى معظم الفطريات على النباتات والحيوانات الميتة والمواد العضوية غير الحية وتقوم بهضم الطعام خارج خلاياها بإفراز عصارات هاضمة تفتت المواد العضوية الى مواد بسيطة تستعملها الفطريات كغذاء لها ولهذا تسمى الفطريات كائنات حية محللة .تقسم الفطريات من حيث تغذيتها إلى فطريات مترممة تعيش على المواد العضوية من بقايا نباتية وحيوانية وهي تحللها وتمتصها .و فطريات متطفلة وهذه تمتص الغذاء من الكائنات الحية وتسبب لها الأمراض .وفطريات متكافلة وهي فطريات تعيش بالتكافل مع مخلوقات حية أخرى أو بتبادل المنفعة . تتكاثر الفطريات بنوعين من التكاثر جنسياً ًولا جنسيا ً توجد الفطريات في الكثير من المجالات التي تخدم الإنسان حيث ان للفطريات دور أساسي ومهم في تحليل الفضلات والنفايات وبقايا النباتات كونها تمتلك القابلية على تفكيك وتحليل السليلوز واللكنين الى مكوناتها وعناصرها الاصلية ،كما أن للفطريات دور كبير في تنظيف البيئة من التلوث الكيميائي وخصوصا ً التلوث بالعناصر الثقيلة من خلال تحويلها من مركبات سامة الى غير سامة وذلك بتفكيكها ،ومن ثم فأنها تحافظ على نظافة البيئة وتعيد العناصر الكيميائية الى البيئة مرة أخرى ،ومن ثم خلق حالة التوازن البيئي ،تستعمل في تقوية وزيادة انتاج بعض النباتات وغيرها . كما أن الفطريات لها دور في المكافحة الحيوية للبعوض الناقل لمسببات مرض الملاريا للإنسان ،وكذلك في مكافحة البكتريا والحشرات والديدان التي تسبب الامراض النباتية .حيث تم تسويق العديد من الأنواع كعوامل للمكافحة البيولوجية للافات الحشرية ومع ذلك يمكن أن تتأثر سلبا ً بمبيدات الفطريات مما يؤدي إلى تقليل امكانات المكافحة البيولوجية إذ تم استخدام كلا المنتجين معا ً في انظمة المكافحة المتكاملة للافات من أجل الآفات الحشرية للتغلب على مشكلة التوافق هذه قام الباحثون بتطوير طفرات مقاومة لمبيدات الفطريات للفطريات الممرضه للحشرات ..(ابو يوسف ،2021) .

2-1 *Trichoderma harzianum* :

يعتبر هذا الفطر احد انواع الفطريات التابعة لجنس *Trichoderma* التابع لقسم الفطريات الكيسية اللاجنسية التكاثر وهذا الفطر واسع الانتشار في التربة وكذلك ينمو على الاوساط الزراعية المصنعة مثل وسط مستخلص البطاطا والدكستروز و وسط الذرة وبدرجة حرارة تتراوح بين (25-30) وينتج جراثيم مخضرة حتى في ظل الظروف البيئية الغير ملائمة ويعتبر من الفطريات العدوانية التي تنتشر بسرعة كبيرة وفطرياتة تتنافس بقوة على الضوء والمعادن والفضاء ويوجد مرتبط بشكل اساسي في الجذور في جميع انواع التربة تقريبا.

1-2-1 فوائد الفطر *Trichoderma harzianum*

قد استخدم في المكافحة الحيوية إذ استفاد من المواد الثانوية المستخرجة من هذا الفطر بكونها عوامل سيطرة حيوية لحماية البذور النباتية والتربة من الإصابة بالفطريات المختلفة مثل

Sclertium Pythium ،Fusarium spp.s Aspergillus niger ،Penicillium spp. spp.

- كما أنه يقوم بتحفيز نمو النبات ،ويساعد النباتات على امتصاص العناصر الغذائية ،وإنتاج هرمونات النمو وحمايتها من مهاجمة مسببات الأمراض من خلال افراز مستقبلات ثانوية ولقد تأكد من انها تعمل على تثبيط النشاط الميكروبي بينما تنشط نمو النباتات .
- له تأثيرات إيجابية أخرى حيث يقلل من الملوثات من خلال تحلل المواد الكيميائية والنفايات المعدنية عن طريق الإنزيمات المختلفة.
- لقد ثبت أن جودة المياه لها تأثير كبير على وظائف هذا الفطر ذلك من خلال الارتباط بالعديد من الأنواع الأخرى ، إنبات الجراثيم ونمو الأنبوب الجرثومي وتطوير الإنزيم وتطوير الفطريات.
- تعد *Trichoderma harzianum* فطريات عالمية ،حيث يتم توزيعها في جميع أنحاء العالم في أنظمة بيئية متنوعة وبيئات طبيعية ،ويتم تطويرها بشكل طبيعي في الأماكن التي تتراكم فيها المواد النباتية العضوية ،مثل بقايا المحاصيل أو التربة الدبالية.

(Adesh Kumar May ,2021) .

يجب السيطرة على أمراض النبات للحفاظ على جودة ووفرة الغذاء والأعلاف والألياف التي ينتجها المزارعون حول العالم .يمكن استخدام طرق مختلفة للوقاية من أمراض النبات أو تخفيفها أو السيطرة عليها . إلى جانب الممارسات الزراعية والبستنة الجيدة ،غالباً ما يعتمد المزارعون بشكل كبير على الأسمدة الكيماوية ومبيدات الآفات .وقد ساهمت هذه المدخلات في الزراعة بشكل كبير في التحسينات المذهلة في إنتاجية المحاصيل وجودتها على مدى المائة عام الماضية .ومع ذلك ،فقد أدى التلوث البيئي الناجم عن الاستخدام المفرط للكيماويات الزراعية وإساءة استخدامها ،فضلا ً عن إثارة الخوف من قبل بعض المعارضين للمبيدات ،إلى تغييرات كبيرة في مواقف الناس تجاه استخدام المبيدات في الزراعة .اليوم هناك لوائح صارمة بشأن استخدام مبيدات الآفات الكيميائية ،وهناك ضغط سياسي لإزالة المواد الكيميائية الأكثر خطورة من السوق .بالإضافة إلى ذلك ،فإن انتشار أمراض النبات في النظم البيئية الطبيعية قد يحول دون التطبيق الناجح للمواد الكيميائية بسبب النطاق الذي قد يتعين تطبيق مثل هذه التطبيقات عليه .وبالتالي ،ركز بعض الباحثين في إدارة الآفات جهودهم على تطوير مدخلات بديلة للمواد الكيميائية الاصطناعية لمكافحة الآفات والأمراض .من بين هذه البدائل تلك التي يشار إليها باسم الضوابط البيولوجية .تتوفر مجموعة متنوعة من الضوابط البيولوجية للاستخدام ولكن المزيد من التطوير والاعتماد الفعال سيتطلب فهماً أكبر للتفاعلات المعقدة بين النباتات والأشخاص والبيئة .تحقيقا لهذه الغاية تم استخدام مصطلحات "المكافحة البيولوجية " والمرادف المختصر لها "المكافحة الحيوية" في مجالات مختلفة من علم الأحياء ،وأبرزها علم الحشرات وعلم أمراض النبات .في علم الحشرات ،تم استخدامه لوصف استخدام الحشرات المفترسة الحية ،النيماتودا الممرضة للحشرات ،أو مسببات الأمراض الجرثومية لقمع مجموعات الحشرات الآفات المختلفة .في علم أمراض النبات ينطبق المصطلح على استخدام المضادات الميكروبية لقمع الأمراض وكذلك استخدام مسببات الأمراض الخاصة بالعائل للتحكم في تجمعات الحشائش .في كلا المجالين يشار إلى الكائن الحي الذي يقمع الآفة أو العامل الممرض بعامل المكافحة البيولوجية biological control agent .

(Pal, K. K. and B. McSpadden Gardener, 2006**).**

3-1 المكافحة الحيوية : تعد المكافحة الحيوية من أهم وسائل برنامج المقاومة لجميع الكائنات المتطفلة والممرضة للنبات فهي عوامل بديلة للمواد الكيميائية ذات الطبيعة السمية للبيئة ،والان تحظى المكافحة البايولوجية للافات برواج وتشجيع متواصل وتطبيق واسع ومتطور فهي تستهدف مسببات أمراض النبات بالمرتبة الأولى .

يتم استخدام تطبيق المكافحة الحياتية لأمراض النبات بشكل متزايد وهذه طريقة محتمله للغاية للحفاظ على البيئة نظيفة ويعتمد التحكم البيولوجي لمسببات الأمراض على استخدام الكائنات الحيه الدقيقة المفيدة التي تقمع أو تمنع العامل المسبب.

1-3-1 طرق المقاومة الحياتية :

1-1-3-1 الاستيراد :

هذه طريقة تقليدية في المكافحة الحياتية وتتضمن جلب الاعداء الملائمة للآفات في منطقة بحث يكون عائلها آفة وليس لها اعداء طبيعيون.

2-1-3-1 الاكثار :

طريقة الاكثار قد تكون لقاحية أو بالغمر بالإطلاق اللقاحي يتوفر ثبات ومكافحة الاجيال اللاحقة للآفات . اما الاطلاق الغمري فانه يتوخى مكافحة المجتمع والاجيال المعاملة معه مع عدم التوقع للسيطرة على المدى البعيد.

مثال:تم اطلاق الزنبور المتطفل (ترايكوجراما) *Trichogramma* متطفل في الاتحاد السوفيتي السابق في عام (1969) في مساحة (2.5) مليون هكتار وفي المكسيك تم انتاج (28) بليون من هذا الطفيلي وذلك للسيطرة على عدد من الآفات الحرشفية الاجنحة .

3-1-3-1 الصيانة او المحافظة :

وهو يتضمن خلق حالات تشجع تواجد الاعداء الطبيعي واستغلالهم الفعال للبيئة يجب توفير المأوى المناسب والكافي للمفترسات والطفيليات من خلال تحورنا للعمليات الزراعية مثل الزراعة المتداخلة او الدورات الزراعية ...الخ اوحمايتها من المبيدات وذلك باستخدامها باقل حد ممكن او محاولة تربيتها لانتاج انواع مقاومة للمبيدات المستخدمة وهو ما سائد في بساتين الفاكهة في استراليا وهولندا وامريكا .

(الحاج إسماعيل ،2009).

2-3-1 تطبيقات المكافحة الحيوية _ تعتبر الأبحاث المتعلقة بآليات المكافحة الحياتية مثيرة للاهتمام بسبب خصائصها البيولوجية .

حيث يعتبر *Rhizoctonia solani* اكثر العوامل المسببة لمرض تعفن الجذور في شتلات التبغ في جمهورية مقدونيا إنه مرض مدمر للغاية يتسبب في إضرار جسمية في إنتاج التبغ بسبب استخدام عدد قليل فقط من مبيدات الفطريات للسيطرة على المرض .يعد استخدام الكائنات الحية الدقيقة المضادة ل *Rhizoctonia solani* *طريقة بديلة ومعاصرة* :تم *تأكيد* *T. harzianum* يعتبر أحد أكثر عوامل المكافحة الحيوية لترايكوديرما فاعلية والذي يستخدم تجارياً للحماية الوقائية من العديد من الفطريات المسببة للأمراض في التربة .حيث بدأ تأثير الترايكوديرما على طفيليات معينه على التبغ .وبدأ في ظروف معملية وتم تقدير تأثير الاختزال القوي .وكانت هذه النتائج المشجعة بمثابة تحريض على دراسة *T. harzianum* *على* *Rhizoctonia solani* وتقدير إمكانية استخدامها لتقليل تعفن الجذور في شتلات التبغ (2011 (Gveroska,Biljan and Ziberoski, Jugoslav,

وتوجد العديد من الدراسات والابحاث الأخرى التي تؤكد اهمية هذه الفطريات ومنها دراسة عن فاعلية الفطر *Trichoderma sp* في خفض شدة المرض وزيادة بعض معايير النمو لبادرات الطماطم المصابة بفطريات التربة المعزولة من مصادر مياه السقي لحقول كلية الزراعة .أظهرت نتائج العزل والتشخيص وجود 16جنساً فطريا ، ًوبينت نتائج اختبار المقدرة الامراضية على بذور اللهانة وفي غرفة النمو على بادرات الطماطم أن جميع الفطريات المعزولة من مصادر المياه قد أظهرت نسب موت و بدرجات متفاوتة .إذ أظهرت معاملة الفطر (*Trichoderma sp*) اقل نسب موت على بذور اللهانة وبادرات الطماطم . (عبد الكريم و حسن،2014) .

وكذلك دراسة عن تأثير معاملة نبات التبغ صنف البرلي بفطر *Trichoderma harzianum* ضد مرض الساق الأسود .بينت هذه الدراسة الأثر الايجابي لمعاملة نباتات التبغ صنف البرلي بفطر *Trichoderma harzianum* كمحرض للمقاومة الجهازية المكتسبة إزاء مرض الساق الأسود المتسبب عن الفطر (*Phytophthora parasitica var. nicotianae*) في بعض الصفات الفيزيائية والكيميائية لورقة التبغ البرلي الجافة وفي الإنتاجية (وزن رطب وجاف) بطريقتي الري والرش وتبين أن أفضل الطريقتين كانت المعاملة بطريقة الري إذ زادت النسبة المئوية للكثافة الظاهرية للأوراق الجافة المعاملة بالفطر *T- harzianum* بطريقة الري. (حسن واخرون ،2021)

وكما أجُريت دراسة عن تأثير مستخلصات الفطرين *Trichoderma harzianum* و *T. viride* على انواع من الفطر *Trichophyton* المسبب للأمراض الجلدية البشرية حيث تم استخلاص الإفرازات الخارجية لهذين الفطرين وحضر أربعة تراكيز هي (2, 1, 0.5, 0.1 ملغم/مل) واختبر تأثيرها مع المقارنة بالمضاد الفطري ketoconazole ضد أنواع مختلفة من الفطر *Trichophyton* والمسبب لأنواع مختلفة من الأمراض الجلدية للإنسان ،وأظهرت النتائج بان لهذه المستخلصات فعالية تثبيطيه كبيرة تجاه الفطريات المرضية المذكورة مع وجود بعض الاختلافات في النسب المئوية للتثبيط ،وبالمقارنة مع النسب المئوية للمضاد الفطري ketoconazole أظهرت النتائج ان لمستخلص الفطر *T.harzianum* الفعالية التثبيطية الأكبر تجاه الفطريات المرضية وخصوصا مع التركيزين (1 و 2ملغم/ مل) بالمقارنة مع مستخلص

الفطر *T.viride* والمضاد الفطري ketoconazole إذ وصلت نسبة التثبيط مع التركيز (2 ملغم/مل) لمستخلص الفطر *T- harzianum* الى 100 % تجاه جميع الفطريات المرضية المدروسة ،وبذلك يجب إجراء اختبارات عديدة للمستخلص لنتمكن من استخدامه كوسيلة فعالة من وسائل المكافحة الحيوية ضد الفطريات الممرضة للإنسان. (الرجبو ، العبيدي، 2011) .

4-1 الطفرات الوراثية :

تعرف الطفرات بانها التغيرات الوراثية الفجائية في الكائن الحي بحيث يكون النسل الناتج مختلفا في شكله وحجمه وتركيبه .وتشمل تغيرات في الجينات وتغيرات في تركيب الكروموسومات وأحيانا يطلق المصطلح على التغيرات في عدد الكروموسومات .

1-4-1 تقسم الطفرات حسب مكان حدوثها إلى :

1- طفرات جينية : وهي تنشأ عن التغير الكيميائي للجين.
2- طفرات كرموسومية : وهي تنشأ عن تغيرات في تركيب الكرموسومات (النقص ، الزيادة ،الانقلاب) بالإضافة الى تغيرات في عدد الكرموسومات وتشمل حالات التضاعف الكرموسومي بأنواعه المختلفة.

2-4-1 تقسم الطفرات حسب المؤثر الى :

1- الطفرات الطبيعية التلقائية : وتظهر بصورة طبيعية في الكائن الحي أي تحدث عند عدم تعرض الكائن الحي لمادة مطفره معروفة بشكل قصدي .

2- الطفرات المستحثة : يمكن ان تحدث هذه الطفرات باستعمال الاشعاع او المواد الكيمياوية .

(المعيني والعبيدي ، 2018).

الفصل الثالث

المواد و طرائق العمل

2- المواد و طريقة العمل Materials & Methods

استخدم الفطر *Trichoderma harzianum (Th-wt)* المعزول والمصنف من قبل (حمودي، 1999) .

أنتجت كونيديا الفطر *(Th-wt)* بعد تنمية العزلة البرية على وسط MEA (Malt extract agar) وحضنت على 24c° لمدة 6 أيام ثم أضيف 5-3ml من الماء المقطر المعقم على سطح الطبق وحك بلطف بواسطة اللوب Loop حسب عدد الكونيديا في المعلق بواسطة شريحة Haemocytometer وعدل العدد في كل اختبار إلى العدد المطلوب.

2-1 المعاملة بالمطفر الكيماوي NTG :-

اتبعت الطريقة التي ذكرها (1978, palva, Nevalainen) والمحورة من قبل (1998, lbraheem) عوملت كونيديا الفطر Th-wt وبواقع 39×10^5 كونيديا /ml بمحلول NTG بتركيز 0.06 % . لمدة 6 ساعات تم نشر 0.1ml من المعلق على سطح الوسط الغذائي MEA وحضنت على 24c° لمدة 6 أيام . عوملت كونيديا الفطر المعاملة بالمادة المطفرة مرة ثانية ولمدة 6 ساعات بنفس المادة . في كل معاملة حضن طبقان على 24c° لمدة 8 ساعات لغرض حساب نسبة القتل.

2-2 الكشف عن قابلية تحمل الفطر *Th-wt* والفطريات المتحصل عليها من عملية التطفير لتراكيز مختلفة من المضاد الفطري Benomyl :-

أختبر اقل تركيز من المضاد الفطري والمسمى تجاريا

[Methyl 1-(butyl-Carbamoyl-2-benzimidazol carbomate)] وكان .250 µg/ml اقل تركيز للقضاء على جميع كونيديا العزلة البرية *Th-wt* استخدمت كل من التراكيز(1000,750,500,250)µg/ml من المضاد الفطري للكشف عن مقاومة الفطر بعد عملية التطفير.

اتبعت طريقة (. 1984, Katan et.al) لتحضير الوسط الصلب الحاوي على المضاد الفطري. لقحت أطباق البتري (petridish) الحاوية على الوسط المدعم بالمضاد الفطري بـ 0.2 ml من معلق كونيديا الفطر Th-wt و الكونيديا المطفرة (10^5 كونيديا/ ml) وبواقع 3 أطباق لكل فطر وحضنت لمدة 3 أيام على24c°.

عزلت 6 مستعمرات مطفره من المعاملة الأولى بالمطفر الكيماوي و 3 مستعمرات مطفره من المعاملة الثانية بنفس المطفر ذات قابلية على مقاومة تراكيز مختلفة من المضاد الفطري وسميت كالأتي وذلك بوضع رمز الفطر Th أولاً ثم رقم المعاملة بالمطفر الكيماوي يتبعها رقم تسلسلي للسلالة المطفرة .

.Th-2-3,Th-2-2, Th-2-1, Th-1-6, Th-1-5, Th-1-4, Th-1-3, Th-1-2, Th-1-1,

3-2 تأثير الفطر *Th-wt* و السلالات المطفره على قابلية الفطر *Rhizoctonia solani* على النمو :-

نمي الفطر *R. solani* في وسط معقم من (دقيق الذرة — الرمل) 96% حبات الرمل و14% دقيق الذرة ، ورطوبة بنسبة 20% (W/V) وتركت لمدة 3 أسابيع على 24c° بعد ذلك نقلت إلى تربة معقمة ذات رطوبة مناسبة و PH 6.0 ثم قسمت إلى أجزاء (0.4 Kg لكل جزء).

نميت العزلة Th-wt والسلالات المطفرة على وسط معقم من بذور الشوفان (شوفان - ماء 1:1 V/W وتركت لمدة 20 ساعة ثم جففت على درجة حرارة الغرفة وسحقت بواسطة طاحونة).

استخدم وسط TME لحساب عدد المستعمرات المتكونة. *CFu (* Colony forming unit *)* (papavizas , 1982) . اخذ تخفيف 1×10^{7} وأضيف إلى التربة الحاوية على الفطر *R. solani* على أن يكون المحتوي الميكروبي الكلي 2×10^{4} g/CFu تربة وغلقت الدوارق بشريط - البرافين - لمنع فقدان الرطوبة وحضنت لمدة 2-4 أسبوع وبواقع 3 مكررات لكل عزلة بعد ذلك حسبت قدرة الفطر *R. solani* على النمو حسب الطريقة التي تعتمد على حساب إنبات بذور الشونذر table-beet colonization والموصوفة من قبل (Papavizas et.al., 1975).

4-2 قدرة كونيديا الفطر *Th - wt* وبعض السلالات المطفرة على البقاء في التربة :-

علقت كونيديا الفطريات (Th-wt, Th-1-4, Th-1-6, Th-2-1, Th-2-2, Th-2-3) بالماء المقطر بواقع 10^{5} كونيديا / ml وأضيفت الى دوارق حجمية حاوية على 200 g تربة طبيعية معقمة ذات رطوبة مناسبة وسدت بشريط البارافين وحضنت لمدة (8,6,4,2,1) أسبوع وبعد كل فترة تم حساب عدد المستعمرات المتكونة بأخذ 5.0 g من التربة الملحقة وأضافته إلى 495 ml من الماء المقطر المعقم ورجه باليد جيداً بعد ذلك نشر 1 ml من الطبقة المائية على سطح وسط TME المدعم بالمضاد الفطري benomyl 1000 ml/µg أما بالنسبة للعزلة Th-wt فلم يدعم الوسط الغذائي بالمضاد الفطري وحضنت على 24c° لمدة 3 أيام.

اعتمد تصميم القطاعات العشوائية الكاملة Randomized complete block diesign في تحليل جميع التجارب واستخدمت طريقة اقل فرق معنوي وعلى مستوى 0.05 لمقارنة النتائج (الراوي وخلف الله ، 1980) .

الفصل الرابع
النتائج والمناقشة

3- النتائج والمناقشة Results and Discussion

ان الفطر *Th-wt* ذات مقاومة عالية للتأثير المميت لمادة NTG بتركيز 0.06 % ويظهر من الشكل(1) ان معدل الانخفاض في القدرة على النمو بطيئاً وهذا يتفق مع ماذكره (1998, Ibraheem) عند معاملة الفطر *Trichoderma hamatum* بنفس المادة بتركيز 0.06 % ووجد (Umran Al-Bakri ,1994) .أن خلايا بكتريا *Micrococcies sp. G* كانت مقاومة للتأثير المميت لنفس المادة بتركيز 0.03% حيث كان معدل الفقد في قابلية النمو منخفض بشكل ملحوظ .

اختبرت قابلية السلالات المطفرة على تحمل المضاد الفطري Benomyl بتركيز (1000,750,500,250) µg/ml وذلك بعد أن ثبت تجريبياً أن الفطر Th-wt مقاوم للمضاد الفطري لحد تركيز 250 µg/ml واعتبر هو اقل تركيز مميت لكونيديا العزلة البرية . وتلاحظ من الشكل (2) أن السلالات المطفرة كانت لها مقاومة متباينة للمضاد الفطري وهذا يدل ان هذه الطفرات لم تكن موجودة في الطبيعة وأنما استحثت نتيجة للمعاملة بالمطفر الكيمياوي (. papavizas et. al ,1981) .

ان السلالات المطفرة المنتخبة من المعاملة الأولى بدأت قدرتها على النمو والانبات تنخفض بزيادة تركيز المضاد الفطري وكانت السلالة Th-1-2 أكثرها تحسسا حيث وصلت النسبة المئوية لتثبيط النمو الى 100% عند تركيز 750 µg/ml والسلالة Th-1-4 ثبط نموها 100% عند تركيز 1000 µg/ml بينما أظهرت السلالات المستحثة من المعاملة الثانية بال NTG مقاومة عالية للمضاد الفطري في جميع التراكيز وكانت السلالة Th-2-3 أكثرها تاثراً إذ كانت النسبة المئوية لتثبيط النمو 35% عند تركيز 1000 µg/ml أما السلالتين Th- 2-1 و Th-2-2 أظهرتا مقاومة عالية للمضاد الفطري حتى في التراكيز العالية وهذا يتفق مع (papavizas et. al. ,1981).

والذي ذكر انه يمكن الحصول على سلالات مطفرة من فطر *T. harzianum* بسهولة ذات مقاومة عالية للمضاد الفطري وذلك بتكرار التعريض للعامل المطفر الفيزياوي. ونجح (1984, Higashio) في الحصول على 50 سلالة مطفره من الفطر *Muco racemosus fres*. No. ذات انتاجية اكبر لانزيم Protease وبفعالية تخثرية عالية وذلك بتكرار معاملة سبورات الفطر بمادة NTG.

كما أكد (1998, Ibraheem) ان اعادة المعاملة بالـ NTG ساعد على انتخاب عزلات ذات انتاجية عالية للأنزيم المخثر للحليب من الفطر *Trichoderma hamatum* .

3 -1 تأثير الفطر Th-wt والسلالات المطفرة على نمو الفطر *R. Solani* :-

اختير الفطر *R.solani* للكشف عن نشاط وقدرة الفطر *Th-wt* والسلالات المطفرة في المقاومة الحياتية وذلك لان هذا الفطر هو من الفطريات الممرضة التي تسبب حالات مرضية كثيرة وعلى مدى واسع من النباتات (Butter, Adams ,1979) .

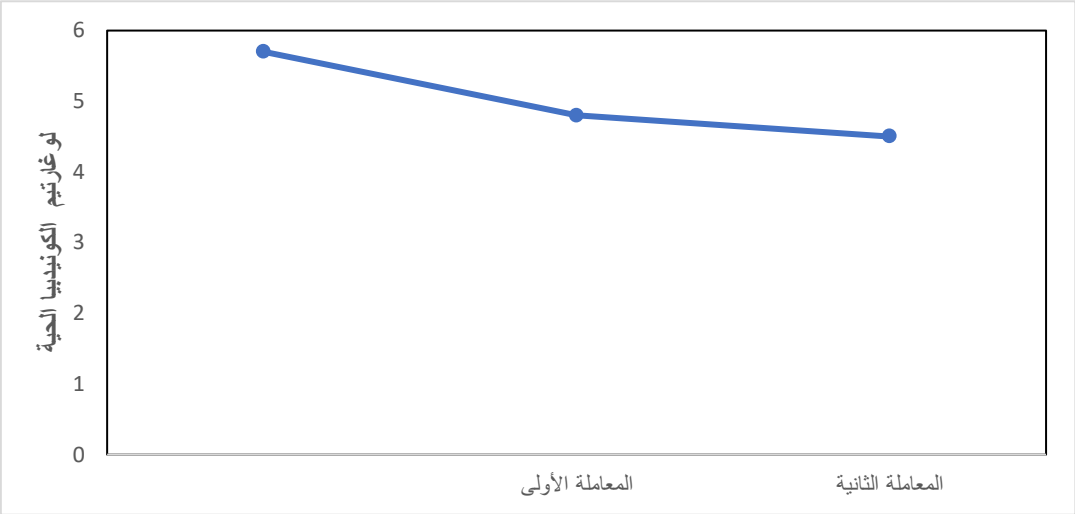
ويصيب هذا الفطر تقريباً جميع الخضروات كما يصيب الاعشاب والاشجار (Bell, Summer, 1994) .

اعتمدت البذور غير الملقحة بالفطريات كمعاملة ضابطة. من الشكل (3) تلاحظ أن السلالة Th-2-1 هي أفضل السلالات في التاثير على نمو الفطر *R.solani* حيث كان متوسط انبات البذور بعد (2-4) أسبوع هو 72 % وهي لا تختلف بشكل معنوي عن المعاملة الضابطة وكذلك الحال للسلالة Th-1-6 اما السلالة Th-1-4 فهي كانت ذات تأثير لا يختلف بشكل معنوي عن المعاملة الضابطة ، اما السلالتان Th -2-2 و Th -2-3 كانت النسبة المئوية للانبات أفضل من العزلة البرية Th -wt الا انها تختلف بشكل معنوي عن المعاملة الضابطة اما بقية السلالات فكان تأثيرها منخفض بشكل كبير وواضح من الشكل. تلاحظ من خلال النتائج انه لا توجد هنالك علاقة بين تحمل تراكيز عالية من المضاد الفطري وقدرة السلالات المطفرة على افراز مواد مضادة لنمو الفطر الممرض والسبب في ذلك يعود الى أن تأثير العوامل المطفرة سواء كانت الفيزياوية أو الكيمياوية قد يكون في أكثر من موقع على جزيئة المادة الوراثية DNA وقد يكون التشفير في هذه المواقع ذات معنى وبالتالي نلاحظ حصول اختلاف في صفة او صفتين للنمط الوراثي الجديد genotype (هير سكوفيتس، 1983) . وفي الدراسة الحالية تلاحظ ان السلالة Th -1-5 كانت مقاومة للمضاد الفطري حيث عند التركيز 1000 µg/ml كانت النسبة المئوية للتثبيط 58% الا ان هذه السلالة كانت ذات تأثير منخفض بشكل معنوي على نمو الفطر *R. solani* مقارنة مع المعاملة الضابطة والعزلة البرية.

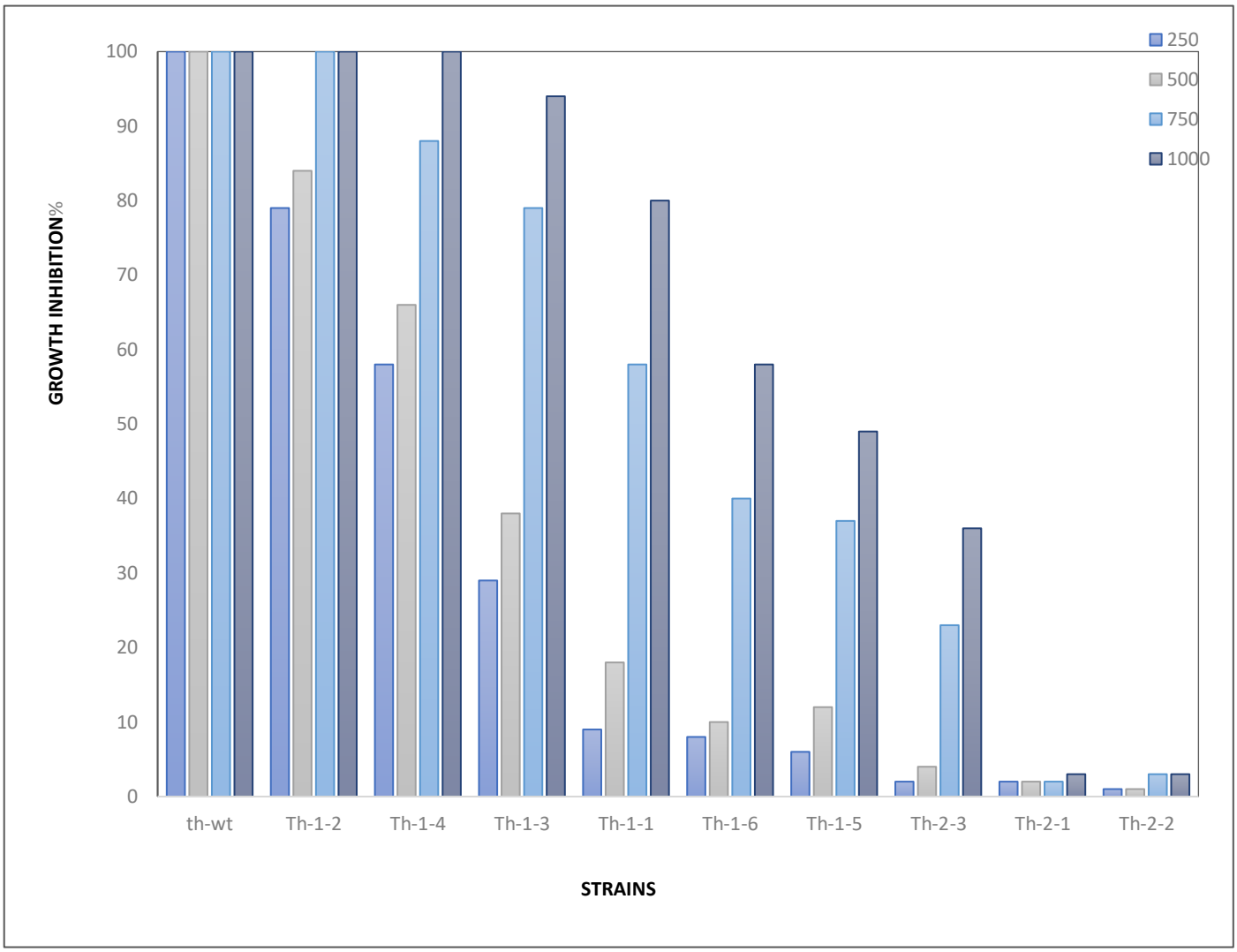
2-3 قدرة كونيديا الفطر Th-wt وبعض السلالات المطفرة على البقاء في التربة :-

تمت دراسة قدرة بعض السلالات المطفرة المنتخبة على البقاء حية في التربة المدعمة بالمضاد الفطري وذلك عن طريق إعادة إنبات كونيديا الفطر في الوسط الغذائي الانتقائي Selective Media للفطر *Trichoderma* ومن الشكل (4) نلاحظ ان أفضل السلالات في القدرة على اعادة الانبات هي(Th-2-1 , Th-1-4, Th-2-2) حيث كان عدد المستعمرات المتكونة بعد مرور ثمانية أسابيع

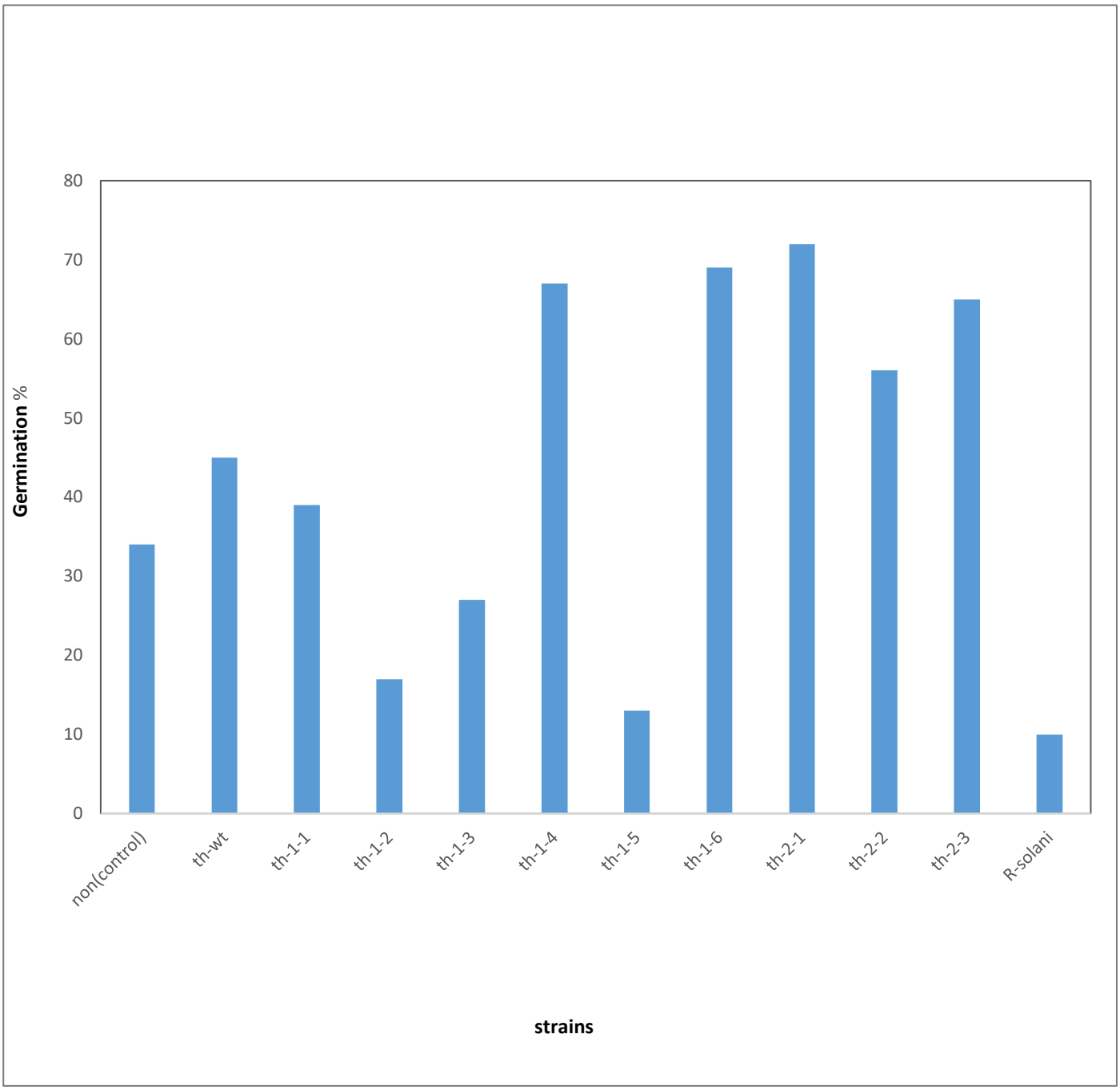
(8.4 ,7.4 ,5.3)×10^3على التوالي بينما نجد ان السلالة Th-2-3 كانت أقل السلالات قدرة على اعادة الانبات وتكوين المستعمرات حيث وصل الى 1.8×10^3 .



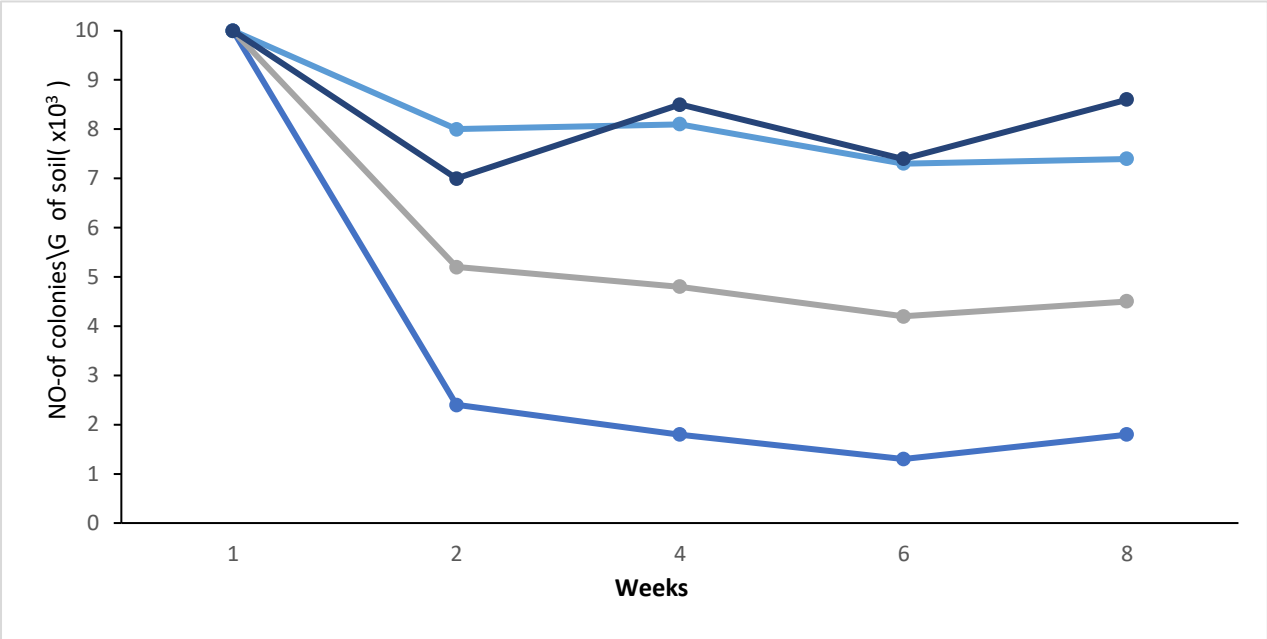
شكل (1) منحنى البقاء لكونديا الفطر *T.harzianum* المعاملة بال NTG.



شكل (2) مقاومة الفطر *T.harzianum* العزلة البرية (Th-wt) والسلالات المطفرة المستحثة بال NTG للمضاد الفطري Benomyl بتركيز (250, 500, 750, 1000) µg/ml .



شكل (3) تأثير الفطر *T.harzianum* العزلة البرية (Th - wt) والسلالات المطفرة المستحثة بال NTG على النسبة المئوية لانبات بذور الشونذر بعد مرور 2-4 أسبوع.



شكل (4) قدرة كونديا الفطر Th-wt وخمسة من السلالات المطفرة على النمو والانبات في التربة بعد مرور (0- 8) أسبوع .

المصادر

Refrences

4- المصادر Refrences

1- أيمان عبد الكريم و حسن، محمد صادق ، (2014) . المكافحة الحيوية لبعض الفطريات الممرضة الملوثة لمياه السقي في حقول كلية الزراعة، دراسة فاعلية الفطر *Trichoderma sp* في خفض شدة المرض وزيادة بعض معايير النمو لبادرات الطماطة المصابة بفطريات التربة المعزولة من مصادر مياه السقي لحقول كلية الزراعة. مجلة ديالى للعلوم الزراعية . المجلد 6 العدد (2) ص 225 .

2-الحاج إسماعيل،د. اياد يوسف 2009 ، الادارة المتكاملة للافات الحشرية المكافحة الحياتية أو الاحيائية أو الحيوية للافات الزراعية.

3-الراوي ، خاشع محمود و خلف الله ،عبد العزيز (1980) تصميم وتحليل التجارب الزراعية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .جامعة الموصل ،مطبعة الجامعة .

4-الرجبو ،مها اكرم ، العبيدي ،عمر مؤيد ،(2011) .تأثير مستخلصات الفطرين *Trichoderma harzianum* و *T.viride* على انواع من الفطر *Trichophyton* المسبب للامراض الجلدية البشرية . مجلة علوم الرافدين . المجلد 22 العدد 2، ص 16- 18.

5-أ.د. المعيني، إياد حسين و أ.د. العبيدي ،محمد عويد غدير ، (2018) ، الطفرات الوراثية ودورها في تربية النبات الأسس العلمية لادارة وإنتاج وتحسين المحاصيل الحقلية.

6-حمودي ، عبد الحميد محمد (1999) تشخيص الفطريات المتواجدة في جذور الحنطة وتأثيرها على الفطرين الممرضين *Fusarium gramnearum* و *Rhizoctonia solani* .

7-صالح، يحيى عاشور ، المعارج ، ابتهال رياض مكطوف (2016) ، تأثير التداخل بين العامل الأحيائي *Trichoderma harzianum* والمبيد الفطري *Moncut* في مرض الرقعه العارية على الحنطه المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* في شمال البصره ، مجلة جامعة بابل. العلوم الصرفة والتطبيقية، العدد 4 ،ص969.

8-عباس ، محمد حمزه و حميد ،محمد عبد الرزاق ، (2006) .تحسين إنتاج حامض الخليك من عزلتين مطفرتين من الفطر *Trichoderma harzianum* باستخدام الاشعة فوق البنفسجية . مجلة أبحاث البصرة(العلميات). العدد الثاني والثلاثون الجزء الثاني ، 27.

9-عزيز، إيمان محمد طاهر ، محمد ، داليا عبد الاله ، ياسين الفت تحسين (2021) .المكافحة الحيوية للافات الحشرية بفعل انواع بكتيرية متواجدة بالبيئه .مجلة العلوم الزراعية والبيئه البيطرية .المجلد (5) . العدد (2) ،ص 28.

10- حمود حسن ، ورامز محمد؛ وطارق حسن، (2021) . دراسة تأثير معاملة نبات التبغ صنف البرلي بفطر *Trichoderma harzianum*ضد مرض الساق الأسود . المجلة السورية للبحوث الزراعية 8 (3) ص 93 .

11-هاله ابو يوسف ، التدقيق: محمود بنات، ماهي الفطريات ، 22 نوفمبر 2021 .

12-هيرسكوفيتس .أ.ه. (1983) أسس علم الوراثة . ترجمة عاصم محمود حسين و جبرائيل برهوم عزيز . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة الموصل ، مطبعة الجامعة .

1-Abdel-Moity ,T.H., Papavizas, G.C. & Shatla, M. N. (1982). Induction of new isolates of *Trichoderma harzianum* tolerant to Fungicides and their expermental use for control of white rof of onion. Phytopathology. 72: 396-400.

2-Adams, G. C. & Butter, E. E. (1979). Serological relation ships among anastomisis groups of *R. solani.* Phytopathology; 69: 629-633.

3- Adesh Kumar , Saishubham Pani & Adarsh Sharma, *Trichoderma harzianum:* An Overview , Current approaches in Agricultural, Animal Husbandary and Allied Sciences for successful entrepreneurship (CAAAHASSE-2021).

4-Al Bakri, G. H. & Umran, *M. A. (1994). Mutagenenesis of anovel halotolerant bacteria (Micrococcus sp.) using ultraviolet light and N-methyl-N-nitro-N-nitresoguanidine*. Iraq J. Microbiol.; 6(2): 55-65.

5-Bailey, M. J. & Nevalainen, K. M. (1981). Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma ressei* mutants with improved production of solubilizing cellulase., Enzyme microb. Technol. 3: 153-157.

6-David, A.A., David, W. R. & Robert, F. N. (1997). *Ecological interactions and Biological control.* Westview press, Adivision of Harper collins publishers, Inc, U.S.A.

7-Gveroska،Biljana and Ziberoski، Jugoslav (2011) ,*The influence of Trichoderma harzianum* on reducing root rot disease in tobacco seedlings caused by Rhizoctonia Solani ; Int. J. Pure Appl. Sci. Technol. 2(2) (2011), pp. 1-11 International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology. P : 2 & 3 .

8-Higashio, K. (1984). Studies on microbial rennets *(especially on milk clotting enzyme produced by Mucor racemosus Fres*. No.. 50). Ph. D. thesis; life science research Institute, Japan.

9-Ibraheem. W.J. (1998). Production and Improvement ofmilk clotting enzyme from *Trichoderma hamatum Ms.C*. thesis, Agrric. Coll., Basrah univ.

10-Katan. T., Dunn, M.t., & papavizas, G.C. (1984). Genetic of fungicide *resestance in Talaromyces flavus.* Can. J. Microbiol. 30: 1079- 1087.

11-Nevalainen, K.M.&palva, E.T. (1978). Production of extracellular *enzymes* in mutants *isolated Trichoderma Viride unable to hydrolyze. cellulose; Appl. And Envi*. Microbiol., 35 (1): 11-16.

12-Pal, K. K. and B. McSpadden Gardener, 2006.Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor DOI. P 1-2 .

13-Papavizas. G.C.; Lewis, J.A. & Abd - El-moity, T.H. (1982). Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities*;* Phytopathology, 72:126-132.

14-Papavizas ,G.C.(1982); *Survival of Trichoderma harzianum in soil and in pea and bean rhizospheres:* Phytopathology, 72:121-125.

15-Papavizas, G.C.;Adams, P.B.,Lumsden, R.D., Lewis, J.A., Dow, R.L., Ayers. W.A.& Kantzes, J.G. (1975). *Ecology and epidemiology of Rhizoctonia Solani in field soil*, Phytopathology, 65: 871-877.

16-Papavizas, G.C.; Lewis, J.A.(1981). *Induction of new biotypes of Trichoderma harzianum resistant to benomyl and other fungicides (Abst.)* Phytopathology, 71:247-248.

17-Shatla, M.N. and Sinclair, J.B. (1963). *Tolerance to* Pentachloronitrobenzene among cotton *isolates of Rhizoctonia solani.* Phytopatology.53:1407-1411.

18-Sumener, D.R. and Bell, D.K. (1994). *Survival of Rhizoctonia spp. And root* diseas in arotation of corn, snap bean, and peanut in microplots. Phytopathology. 84:113-118.

19-Templeton, G.E. and smith, R.J. (1977). Managing weeds with pathogene. In Hrosfall and cowling 167-176.

20-Yuyun Fitriana - Shinobu Shinohara - Katsuya Satoh Issay Narumi. Tsutomu Saito (2015), *Benomyl-resistant Beauveria bassiana* (Hypocreales:

Clavicipitaceae) mutants induced by ion beams, Appl Entomol Zool (2015) 50:123.