



تقييم فاعليه النواتج الأيضية الثانوية لفطر *Trichoderma* spp. على فطر *Fusarium oxysporum*

علي أبو القاسم العاقل^{1*}، سهير المختار برقدو²

¹: قسم علم النبات، كلية العلوم – جامعة طرابلس

²: قسم علم النبات، كلية العلوم – جامعة الزاوية

Corresponding author: ali.elagael@yahoo.co.uk

ARTICLE INFO

Article history:

Received :29/07/2024

Received in revised form 14/08/2024

Accepted 21/08/2024

ABSTRACT

أثبتت *Trichoderma* نجاحاً كبيراً كعامل مكافحة حيوية ضد معظم مسببات الأمراض النباتية منها فطر *Fusarium oxysporum* بواسطة عدة ميكانيكيات أهمها إنتاجه للمستقلبات الأيضية الثانوية في ما يعرف بالتضاد الحيوي.

عُزل فطر *Trichoderma* من المنطقة المحيطة بجذور نبات الزيتون على الوسط المغذي الانتقائي *Trichoderma* selective media (TSM)، اختبرت فاعلية ثماني عزلات على تثبيط فطر *Fusarium oxysporum* باستخدام طريقة اختبار الطبق المزدوج، طريقة الاطباق المقلوبة وطريقة غشاء السلوفان على الوسط المغذي آجار ديكستروز البطاطس. تم اختيار العزلة (T3) التي أعطت أفضل فاعلية في تثبيط الفطر الممرض في جميع الاختبارات التي استخدمت في هذه الدراسة. عُرِفَت المستقلبات الأيضية الثانوية للعزلة (T3) باستخدام كروماتوغرافيا الغاز مطياف الكتلة Gas chromatography mass spectrometry. أظهرت النتائج أن المستقلبات الأيضية الناتجة من مستخلص *Trichoderma* على وسط مرق ديكستروز البطاطس احتوت على 21 مركباً وكان المركب الرئيسي Phenylethyl Alcohol.

أكدت نتائج هذه الدراسة فاعلية تضادية لهذه المستقلبات في تثبيط فطر *F. oxysporum* عندما اختبرت بطريقة الانتشار في الآجار Agar well diffusion assay، وأظهرت الدراسات السابقة أن العديد من هذه المستقلبات الأيضية كان لها فاعلية كبيرة مضادة للفطريات والبكتيريا المسببة لأمراض النبات وأن البعض منها كان ضمن الاستخدامات الصيدلانية.

الكلمات المفتاحية: *Trichoderma*، النواتج الأيضية الثانوية، *Fusarium oxysporum*، مرض الذبول

ABSTRACT

Trichoderma has been achieved great success as a biological control agent against most plant pathogens, including *Fusarium* spp. by several mechanisms, the most important of which is the production of secondary bioactive metabolites. *Trichoderma* spp. were isolated from the area around the roots of the olive plant using *Trichoderma* selective medium. Eight isolates were obtained and evaluated for their ability to inhibit *Fusarium oxysporum* using the dual plate bioassay, the inverted plates, and the cellophane membrane methods on Potato dextrose agar. Through these tests, the isolation (T3) was selected based on its ability for inhibit *F. oxysporum* in all tests used in this study for further investigation using GC-MS.

These metabolites were detected and identified using gas chromatography-mass spectrometry. The results showed that the metabolites resulting from *Trichoderma* extract on the potato dextrose broth medium contained 21 compounds and the main compound was Phenylethyl Alcohol.

The findings of this study demonstrated the antagonistic effectiveness of these metabolites in inhibiting *F. oxysporum*, as assessed by the agar diffusion assay. Previous research has shown that various metabolic compounds influence significant antifungal and antibacterial properties against pathogens responsible for plant diseases, with some even being used in pharmaceutical applications.

Keywords: *Trichoderma*, secondary metabolites, *Fusarium oxysporum*, wilt disease

1. المقدمة

قدرت الخسائر الناتجة عن مسببات امراض النبات في محاصيل الفاكهة (78٪) والخضروات (54٪) والحبوب (32٪) على وجه التحديد، فإن الأمراض التي تسببها مسببات الأمراض الساكنة والمنقولة عن طريق التربة والبذور هي أكثر المسببات التي تؤدي الى خسائر اقتصادية كبيرة للمحاصيل المهمة [1].

من أهم الفطريات المنقولة عن طريق التربة هو جنس *Fusarium* المسبب للعديد من الأمراض النباتية والتي أهمها الذبول الوعائي على العديد من النباتات على مستوى العالم [2-1]، وخاصة العائل الاقتصادي نبات الزيتون [3]، علاوة على إنتاجه لبعض السموم الفطرية الضارة بصحة الإنسان والحيوان [4].

الهدف من أي طريقة لإدارة امراض النبات هو الحد من نسبة وشدة الإصابة بالامراض في النباتات [5]. إلا أنه لوحظ في العقود الأخيرة ازدياد استخدام المبيدات، للحد من الخسائر الاقتصادية الناجمة عن هذه المسببات المرضية، خطورة الاستخدام المفرط لهذه المبيدات وما تسببه من أضرار بيئية كبيرة وتأثيرها على صحة الانسان والحيوان علاوة على دخول هذه المبيدات في السلسلة الغذائية وظهور صفة المقاومة لهذه الكيماويات من قبل مسببات الأمراض، مما أدى للبحث عن بدائل استخدام المبيدات وهي الادارة المتكاملة لأمراض النبات Integrated Pest Management (IPM) للحد من المشاكل الناجمة عن الاستخدام المكثف غير المقنن لمبيدات الآفات كإحدى عوامل التلوث [6].

جنس *Trichoderma* احد الفطريات الخيطية الموجودة في جميع أنواع التربة [7]، وتم وصفه لأول مره سنة 1794 [8]، كاحد أهم عوامل لمكافحة الحيوية ضد مسببات الامراض النباتية في الحقل أو تحت ظروف الزراعة المحمية [9-13]، من أهمها العديد من أنواع فطر *Fusarium* [23]، الى جانب استخدامها كمعزازات نمو للنباتات Plant growth promoters [14-15]، فهي أيضاً واحدة من الفطريات التي تمت دراستها على نطاق واسع في العديد من التطبيقات الصناعية، الدوائية والبيئية [16-17].

أكثر أنواع *Trichoderma* شيوعا هي *T. harzianum*، *T. vitans* و *T. viride* [18-19].

سجل مركز وقاية النبات في بريطانيا عام 2001، ستة أنواع من *Trichoderma* للاستخدام التجاري في بريطانيا ضد العديد من مسببات الأمراض النباتية التي تنتقل عن طريق التربة وقد سجلت رسمياً كمبيدات حيوية (Biopesticides) [20].

يعتمد نجاح استخدام *Trichoderma* في مكافحة الحيوية على عدة آليات، بشكل غير مباشر من خلال المنافسة على الغذاء والمكان، التضاد الحيوي وآليات الحث الدفاعية للنبات، أو بشكل مباشر عن طريق التطفل الفطري hyperparasite [21]. أظهرت الدراسة التي قام بها (Kushwaha و Verma [22]، أن فطر *T. harzianum*، *T. viride* و *T. Hamantum*، لديها فاعلية كبيرة على تثبيط نمو الفطريات المسببة للأمراض، والتي وصلت في بعض الأمراض الى نسبة

90% [23]. كما أشارت الدراسات إلى أهمية فطر *Trichoderma* في مكافحة فطر *Fusarium* على العديد من العوائل النباتية كما في الدراسة التي قام بها Zhi-xiang وآخرون [24]. الذي أشار على تثبيط فطر *Fusarium* بنسبة تزيد عن 70% وفي تلك التي قام بها Shah [25]، حيث ذكر أن فطر *T. viride* أثبت فاعلية على تثبيط فطر *F. solani* بنسبة 82.91% و *F. oxysporum* بنسبة 82.38%.

تستخدم *Trichoderma* ليست فقط كعامل لمكافحة الفطريات الممرضة بل تستخدم أيضاً لمكافحة البكتيريا الممرضة [26]. كما أوضحت الدراسة التي قام بها Saleh وآخرون [27]، أن *T. viride* و *T. reesei* كانت فعالة للغاية ضد العديد من أجناس البكتيريا المسببة للأمراض. كما لها أيضاً فعالية ضد النيماتودا [28].

يتميز فطر *Trichoderma* بالعديد من الخصائص التي تجعلها ذات أهمية كبيرة، منها الكفاءة العالية على النمو والتكاثر بإنتاج أعداد هائلة من الأبواغ مقارنةً بغيره من الأحياء الدقيقة الأخرى، وتحمل العديد من الظروف البيئية القاسية إلى جانب قدرته الكبيرة على إنتاج المستقلبات الأيضية الثانوية ذات الطبيعة المتطايرة أو غير المتطايرة ذات الأهمية في التطبيقات الطبية والصناعية والزراعية [29-30].

أظهرت العديد من الدراسات أن جميع أنواع فطر *Trichoderma* المعزولة من التربة كانت قادرة على إنتاج مستقلبات إيضية ثانوية خارج الخلية ضد مسببات الأمراض النباتية الفطرية المختلفة في اختبار التضاد الحيوي [31]، تستمد معظم البيانات على افتراض المضادات الحيوية المنتجة في المعمل هي المركبات المسؤولة عن مكافحة الحيوية في النباتات حقلياً، من المعروف أن العديد من سلالات *Trichoderma* تثبط نمو الفطريات في المعمل عن طريق إنتاج واحد أو أكثر من المضادات وقد وُصف إنتاج المضادات الفطرية كوسيلة قوية في مكافحة العديد من مسببات الأمراض أو الحد من نشاطها [32]، وقد ذكر Benítez وآخرون [33]، أن آليات تثبيط الفطريات يمكن توضيحها عن طريق تتبع إنتاج المستقلبات الثانوية والمركبات المحللة لجدار الخلية الفطرية. تشمل المضادات الفطرية مجموعة غير متجانسة كيميائياً من المركبات العضوية منخفضة الوزن الجزيئي التي ينتجها فطر *Trichoderma*. المنتجات الميكروبية قد تكون معقدة للغاية في تركيبها الكيميائي لدرجة أن مركباً واحداً قد يحتوي على شقين كيميائيين أو أكثر مختلفين تماماً [34]، هذا التعقيد في هيكلها قد يجعل المنتجات الطبيعية متنوعة كيميائياً وبيولوجياً.

تم عزل العديد من سلالات *Trichoderma* التي تنتج المضادات الفطرية في المعمل من أنواع مختلفة من التربة والعوائل النباتية. يشير هذا التوزيع الواسع الواضح إلى أن *Trichoderma* المنتجة للمضادات الحيوية هي مكونات شائعة في التربة والبيئات المرتبطة بالنباتات في جميع أنحاء العالم.

ذكر Yassin وآخرون [31]، أن فطر *Trichoderma* أظهرت تضاداً قوياً معملياً ضد مسببات الأمراض النباتية الفطرية المختلفة في اختبار التضاد الحيوي عن طريق إنتاج مستقلبات مضادة للفطريات خارج الخلية.

كما وجد Sobowale وآخرون [35]، ذكر أن المستقلبات في رواسح مزرعة *Trichoderma* قد يكون لها القدرة على السيطرة على العديد من الأمراض النباتية التي يسببها فطر *Fusarium* كما أشار Stracquandano وآخرون [36]، في دراستهم، حيث كان راسح المزرعة الخالية من الخلايا لسلالة *Trichoderma* نشطاً ضد إنبات الأبواغ الكونيدية الكبيرة (Macroconidia) وكذلك تثبط نمو الميسيليوم للعديد من أنواع فطر *Fusarium*.

يأتي فطر *Trichoderma* كأحد أنجح عوامل مكافحة الحيوية، حسب ما ذكر Verma وآخرون [26]، بأن ما يصل إلى 60% من مبيدات الفطريات الحيوية المسجلة المستخدمة في الزراعة اليوم هي تركيبات قائمة على فطر *Trichoderma*. هناك العديد من المنتجات المتاحة في السوق للاستخدام في الحقل ضد العديد من مسببات الأمراض [37]. تفرز *Trichoderma* العديد من مجموعات المستقلبات الثانوية التي تثبط الفطريات المرضية النباتية مثل (بيرونات Pyrones، كونينجين Koninginins، فيريدين Viridins، مركبات نيتروجين غير متجانسة Nitrogen Heterocyclic، أزافيلونات Azaphilones، بوتوليدات Butenolides وهيدروكسي لاكتونات Hydroxy-Lactones، مستقلبات أيزوسيانو Isocyno Metabolites، ديكتوبيريلازين Diketopiperazines وبيبتايبول Peptaibols) [38]، بما في ذلك العديد من المركبات المضادة للفطريات خاصة *F. oxysporum* التي قدمت كمثال لا للحصر لهذه المضادات وهي، 2-heptanone، 2-، 3,5,5-trimethyl β-phellandrene، pentylfuran، cyclohexene، 6-pentyl-2H-pyran-2-one، Koninginin، Cremenolide [39-40].

تظهر العديد من الدراسات أن هذه المركبات فعالة في التحكم في مرض الذبول الفيوزاريومي للعديد من المحاصيل [41].

ينتج فطر *Trichoderma* العديد من المركبات الأخرى التي انتشرت الدراسات فعاليتها ضد مجموعة من الفطريات الهامة حيث أظهر مركب بيرولنيترين pyrrolnitrin على سبيل المثال نشاطاً فعالاً ضد مجموعة واسعة من الفطريات البازيدية، الفطريات الناقصة والفطريات الأسكية، بما في ذلك العديد من مسببات الأمراض الهامة اقتصادياً مثل *Verticillium*، *Botrytis cinerea*، *Rhizoctonia solani* و *Sclerotinia sclerotiorum* [34-42]، كما تم تأكيد أن بعض سلالات *Trichoderma* على أنها تثبط أنشطة مسببات الأمراض النباتية بإنتاج باسيدوباكيتين Basidobactin [43-44].

ذكر في العديد من الدراسات، الإجراء المناسب لاستخلاص العديد من المضادات الحيوية والفطرية التي ينتجها *Trichoderma* المعزولة من المنطقة المحيطة بجذور النباتات [45]، كما تم مؤخراً عزل وتعريف مجموعة من المضادات الحيوية الجديدة من سلالات *Trichoderma* المعروفة [46].

يتم فصل المضادات الفطرية عن المواد الأخرى عن طريق ضبط كمية العينة المطلوبة واختيار المذيبات المناسبة. يمكن لهذه الطريقة استعادة استخلاص مركب أو مركبات محددة، والذي له خصائص ذوبان مختلفة. بشكل عام، يتم فصل العينات باستخدام بعض المذيبات المختلفة مثل (ثنائي إيثيل إيثر Diethyl ether أو ثنائي كلورو ميثان Dichloromethane)، يشار إلى عمليات الاستخلاص هذه، باسم الغسلات والتي تهدف في المقام الأول إلى إزالة المواد الكيميائية غير المرغوب فيها، باسم الغسلات، يشيع استخدام عدة أنواع من الغسلات منها الأحماض المائية مثل حمض الهيدروكلوريك أو حمض الخليك لاستخراج المركبات الأساسية؛ والقواعد المائية مثل هيدروكسيد الصوديوم أو كربونات الصوديوم أو بيكربونات الصوديوم لاستخراج المركبات الحمضية [47].

هناك قدر هائل من المعلومات حول اختيار الكائنات الحية الدقيقة المضادة من الطبيعة وتأثيراتها وتوصيف المستقلبات الايضية، أشارت العديد من الدراسات عن عزل وتحديد المستقلبات المضادة للفطريات والمركبات المتطايرة [48-50]

يتم وصف المستقلبات الايضية الفعالة لأنواع من فطر *Trichoderma* ضد *F. oxysporum* بالتخلص من نمو *Trichoderma* النامية في الوسط المغذي السائل، وفصل مستقلبات الايض منخفضة الوزن الجزيئي من وسط الاستزراع بعد إزالة الكتلة الحيوية *Trichoderma* عن طريق الطرد المركزي، واختبار الطافي بعد الترشيح بالمرشحات البكتيرية. تم اختبار الترشيح باستخدام مقاييس انتشار في الأجار لقدرته على تثبيط الفطر. أظهرت نتائج دراستهم أن المرشح الخالي من الخلايا يثبط بشكل فعال فطر *F. oxysporum*.

تم فصل وتعريف عدد من المضادات الحيوية التي تنتجها عوامل مكافحة الحيوية، ولكن من المعلومات المحدودة المتاحة يبدو أن المضادات الحيوية هي نفسها أو مشابهة لتلك التي تم التحقيق منها المستخدمة كعقاقير طبية. وقد اقترح بعض الباحثين أن استخدام مثل هذه الأنواع، أو مستقلباتها، قد يكون بديلاً لوقاية النباتات بدلاً من استخدام المبيدات الكيميائية بالإضافة إلى ذلك، تم العثور على إنتاج العديد من معزازات ومنظمات النمو مثل هرمونات النمو كما هو الحال إندول 3. حمض الخليك [32-42].

هدفت هذه الدراسة الى عزل فطر *Trichoderma* من التربة وتقييم قدرة العزلات في اختبار التضاد الحيوي (Antibiosis) معملياً (in

vitro) في تثبيط فطر *F. oxysporum* المعزول من شتلات الزيتون المصابة بمرض الذبول، ثم استخلاص وتنقيسة المستقلبات المضادة الفطرية Antifungal Metabolites لفطر *Trichoderma* وتقييم فعاليتها على تثبيط نمو *F. oxysporum*. تعريف وتوصيف المستقلبات المضادة للفطريات باستخدام جهاز كروماتوغرافيا الغاز / قياس الطيف الكتلي Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS).

2. المواد وطرائق البحث:

أجريت هذه الدراسة بدايةً من خريف 2022، في مختبرات قسم وقاية النبات بكلية الزراعة، جامعة طرابلس، بالتعاون مع مركز البحوث الزراعية بالقاهرة جمهورية مصر العربية.

1.2. الأحياء الدقيقة في الدراسة

عزلت فطر *Trichoderma* الذي عزل من التربة المحلية من مدينة العجيلات والكائن الممرض *F. oxysporum*، المعزول من جذور شتلات نبات الزيتون المصابة بالذبول من أحد مشاتل منطقة عين زارة - طرابلس في ربيع 2022.

لوحظت أعراض ذبول نموذجية على شتلات الزيتون وقد ظهرت الأعراض في شكل ذبول تدريجي مصحوب بتلون وجفاف الأوراق ثم تساقطها، ثم موت الشتلات.

1.1.1. عزل فطر (*Trichoderma* spp.)

تم إزالة التربة الملتصقة بعناية من الجذور وجمع التربة المحيطة بجذور شتلات نبات الزيتون (تربة الغلاف الجذري) (10 جم / نبات) في أطباق بتري معقمة. تم تجفيف 100 جرام من تربة الغلاف الجذري في الهواء في المعمل لمدة 8 أيام عند درجة حرارة الغرفة لتقليل عدد الخلايا الميكروبية النباتية الحية وبالتالي المساعدة في عزل *Trichoderma* [51].

حضرت معلقات التربة بإضافة 1 جم من التربة إلى 9 مل من ماء مقطر معقم والهز لمدة 15 دقيقة. ثم تم تخفيف كل معلق بالتسلسل حتى 10⁻⁶، ثم تم نشر 0.1 مل على الوسط الانتقائي *Trichoderma* selective

Agar medium (TSM) [52].

كُشف على الأطباق بانتظام، وتم نقل لقاح من كل مستعمرة نامية واحدة ممثلة لكل نوع من الأنواع المختلفة إلى وسط أجار جديد للحصول على مزارع نقية، وتم بعدها تحضير العزلات ودراسة الخصائص المجهرية للنمو الفطري ثم تخزين العزلات المنقاة على وسط أجار دكستروز البطاطس المائل عند 4 درجات مئوية [53].

2.1.2. عزل الفطر الممرض *F. oxysporum*

غُسِلَت الجذور وقاعدة الساق لشتلات نبات الزيتون المصابة التي ظهرت عليها أعراض الإصابة بالذبول تحت ماء الصنبور ثم تم تقسيمها إلى أجزاء صغيرة (1.5 سم)، وتعقيمها سطحياً في هيبوكلوريت الصوديوم المائي (10٪ حجم / حجم) لمدة 5 دقائق ثم تم الغسل ثلاث مرات في ماء مقطر معقم، وضعت القطع بعد ذلك على أجار دكستروز البطاطس (PDA) الذي يحتوي على كبريتات الستربتوميسين (100 ميكروجرام مل⁻¹) والنيوميسين (50 ميكروجرام مل⁻¹) والكلورامفينيكول (50 ميكروجرام مل⁻¹)، أُضيفت المضادات الحيوية إلى الأجار المنصهر بعد التعقيم بعد تبريده إلى حوالي 50 درجة مئوية، تم تحضين جميع الأطباق الملقحة عند 28 درجة مئوية لمدة 6 أيام [54]، تم التعرف على الفطريات المعزولة من خلال الخصائص المزرعية والمجهريّة للنمو الفطري وشكل الأبواغ [55]، تم بعدها نُقِيت العزلات على أجار دكستروز البطاطس (PDA) ثم التحضين عند 28 درجة مئوية لمدة 6 أيام وخُزنت في المبرد عند 4 درجات مئوية، حفظت العزلات في أنابيب الأجار المائل للمدى الطويل (أكثر من ثلاثة أشهر)، تم حفظ اقراص الفطر mycelia (قطر 4 مم) في 20 مل من الماء المقطر المعقم في درجة حرارة الغرفة (أكثر من 6 شهور).

2.2. اختبار التضاد الفطري الحيوي المزدوج على الأوساط المغذية

تم تقييم جميع عزلات *Trichoderma* المختبرة لقدرتها على تثبيط أنواع *F. oxysporum* على الوسط المغذي أجار ديكستروز البطاطس PDA في اختبار التضاد الحيوي، أُخذ قرص بقطر 5 مم من حواف مستعمرة فطر *F. oxysporum* بعمر ستة أيام وزرع على حافة طبق بتري قطره 9 سم بشكل متناظر مع قرص من عزلات الفطر *Trichoderma* بعمر ثلاثة أيام على الوسط المغذي PDA، زرعت ثلاثة أطباق من كل معاملة، واعتبر الطبق الواحد مكرراً، أما معاملة الشاهد فتمت زراعة قرص اللقاح للفطر الممرض بالطريقة ذاتها ولكن بدون وجود الفطر *Trichoderma* في الطبق (Khalid و Sahi) [56]، حضنت المعاملات عند درجة حرارة 25 °م ± 1 لمدة 6 أيام، وتم تسجيل النتائج بقياس تثبيط نمو الفطر الممرض *F. oxysporum* كما في المعادلة الآتية [57].

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = 100 \times \frac{n_1 - n_2}{n_1}$$

n_1 = متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر الممرض في معاملة الشاهد

n_2 = متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر الممرض في معاملة *Trichoderma*.

3.2. اختبار التضاد الحيوي للمركبات المتطايرة بطريقة الأطباق المقلوبة

على الأوساط المغذية

أُجريت هذه الدراسة باتّباع طريقة Webster و Dennis [58]. حقنت عزلات *Trichoderma* مركزياً بوضع قرص 5 مم من مزرعة عمرها ثلاثة أيام على الوسط المغذي PDA وحضنت عند 26 ± 2 م لمدة ثلاثة أيام، ثم استبدال الغطاء العلوي من كل طبق بتري الملقح بعزلات *Trichoderma* بطبق من الوسط المغذي PDA الملقحة مركزياً بالعامل الممرض، ثم الحفاظ على طبق بتري مع وسط PDA بدون *Trichoderma* في الجزء السفلي والحفاظ على الجزء العلوي مع مسبب المرض والجزء الثاني من الطبق لكل منهما عبارة عن الوسط المغذي فقط كشاهد تم غلق زوج من 1 طبق بتري بشريط البارافين وتحضينه لمدة 4-6 أيام، بعد الحضانة تم حساب نسبة تثبيط نمو فطر *F. oxysporum* كما في المعادلة السابقة [57].

4.2. اختبار التضاد الحيوي للمركبات غير المتطايرة بطريقة غشاء

السلفان على الأوساط المغذية

تم وضع قطعة من السلفان المعقم بقطر 9 سم على وسط PDA وتم وضع قرص قطرة 5 مم من عزلات *Trichoderma* المعزولة على PDA، حضنت المعاملات عند 20 درجة مئوية لمدة 4 أيام بعد فترة الحضانة، تمت إزالة السلفان وتم وضع قرص قطرة 5 مم من *F. oxysporum* من حواف مزرعة حديثة، حضنت المعاملات عند درجة حرارة 20 مئوية لمدة 6 أيام أخرى، تم حساب النسبة المئوية لعمر RI حسب المعادلة $RI = 100 \times (R_2 - R_1) / R_2$ كما في الدراسة التي قام بها Watts وآخرون [59].

حيث كان:

$$RI = \text{متوسط قيمة ثلاث مكررات لكل عزلة}$$

$$R_1 = \text{متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر الممرض في معاملة}$$

$$Trichoderma$$

$$R_2 = \text{متوسط نصف قطر مستعمرة الفطر الممرض في معاملة}$$

الشاهد.

5.2. تحضير طافي المزرعة لفطر *Trichoderma*

لدراسة فاعلية المضادات الفطرية في مكافحة الحيوية، تم تحضير اللقاح لكل عزلة بإضافة قرص بقطر 4 ملم من النمو لفطر *Trichoderma* في 5 مل من الوسط الغذائي السائل مستخلص الشعير لمدة 24 ساعة عند 28 درجة مئوية. تم نقل لقاح 2 مل لكل عزلة تريكوديرما إلى 100 مل من الوسط المعدل. تم تحضين العزلات عند 28 درجة مئوية في هزاز متبادل عند 150 دورة في الدقيقة لمدة 6 أيام. تم الحصول على المادة الطافية عن طريق الطرد المركزي للمزرعة الفطرية عند 8000 دورة في الدقيقة لمدة 20 دقيقة، وتم ترشيح المواد الطافية من خلال المرشحات البكتيرية

الغشائية المعقمة بقطر 0.2 ميكرون لضمان إزالة كل نمو *Trichoderma* [46].

تم استخدام طريقة الانتشار في الآجار Agar Diffusion Method لتقييم النشاط المضاد للفطريات.

7.2. التنقية الجزئية للمستقلبات الايضية المضادة للفطريات باستخدام الاستخلاص بالمذيبات

خلط المواد الطافية (125 مل) لكل عذلة مع 200 مل من محلول بيكرينات الصوديوم المائي المشبع في ورق مخروطي جاف وتقسّم إلى ثلاثة اقسام. وإضافة كل قسم إلى قمع فصل وتم إذابته باستخدام 150 مل من ثنائي إيثيل الإيثر ($C_4H_{10}O$) أو ثنائي كلورو ميثان (CH_2Cl_2). تم فصل المحلول إلى طبقتين (الطبقة العضوية والمائية) وتم التخلص من الطبقة المائية [60].

تم إضافة حمض الهيدروكلوريك (2N) إلى جزء واحد من الطور العضوي المرشح والأس الهيدروجيني تم تعديله إلى الرقم الهيدروجيني 2، كما تم إضافة حمض الهيدروكلوريك (2N) إلى جزء ثانٍ حتى أصبح الرقم الهيدروجيني محايدًا الرقم الهيدروجيني 7، بالنسبة للجزء الثالث، إضافة هيدروكسيد الصوديوم (2M NaOH) حتى يصبح الرقم الهيدروجيني قلويًا الرقم الهيدروجيني 11 [61].

تم إضافة 100 مل من ثنائي إيثيل الإيثر أو ثنائي كلورو ميثان مرة أخرى إلى كل جزء، وتم التخلص من الطور المائي وتم الاحتفاظ بالطور العضوي العلوي لكل عينة كمنتج حمضي، ومتعادل وقلوي. كل قسم تم تجفيفه باستخدام قليل من كبريتات المغنيسيوم اللامائية لإزالة أي بقايا مائية ثم تصفيتها باستخدام ورق ترشيح (Whatman، 180 مم، Whatman Ltd إنجلترا) للتخلص من كبريتات المغنيسيوم قبل التبخير حتى الجفاف التام بالتخلص من ثنائي إيثيل الإيثر أو ثنائي كلورو ميثان. تم جمع البقايا (عمومًا ذات شكل يشبه الطين) في زجاجة معقمة صغيرة بعد إذابتها في حجم صغير من ثنائي إيثيل الإيثر وتجفيفها باستخدام الهواء في وعاء التبخير (Air from a fume cupboard) حتى يتبخر ثنائي إيثيل الإيثر [62].

تم تعليق المتبقيات من الاستخلاصات الحمضية والقاعدية والمتعادلة في 10% (v/v) ثنائي ميثيل سلفوكسيد (DMSO) في الماء المقطر المعقم وتقييمها للنشاط المضاد للفطريات، باستخدام المذيب كشاهد [63].

6.2. تقييم النشاط المضاد للفطريات باستخدام اختبار الانتشار في الوسط المغذي Agar Diffusion Method

تم زراعة فطر *Fusarium* على PDA عند 25 درجة مئوية لمدة 6 أيام [64]. تم الحصول على ابواغ الفطر عن طريق إضافة 10 مل من الماء المقطر المعقم إلى كل طبق وتعليق الأبواغ باستخدام قضيب زجاجي معقم، تم بعد ذلك نقل المعلق إلى أنبوب اختبار معقم باستخدام

قمع معقم مبطن بمرشحات معقمة، تم حساب عدد الأبواغ باستخدام جهاز قياس الكريات الدموية Haemocytometer وتعديلها إلى 10^5 كونيديا مل⁻¹. تم استخدام (0.1 مل) من معلق الأبواغ وطرحه على سطح الوسط المغذي، وإزالة أقراص الآجار (قطرها 5 مم) من أطباق الوسط المغذي PDA الملقة باستخدام ثاقبة فلين معقم وتم إضافة 40 ميكرو لتر من مستخلصات المواد الطافية الحمضية والقاعدية والمتعادلة إلى الحفر، كلاً على حده، استخدمت أربعة مكررات لكل عذلة وحُضِنَت الأطباق عند 15 درجة مئوية لمدة 7 أيام، يشير النشاط المضاد للفطريات إلى منطقة تثبيط واضحة [65].

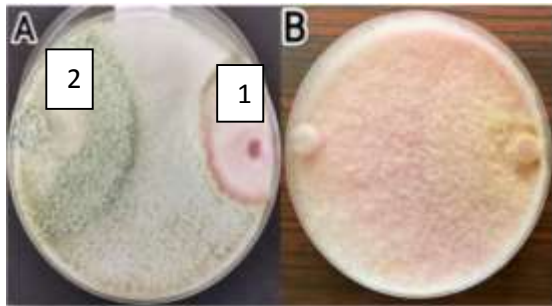
8.2. الفصل الكروماتوغرافي الغازي Gas Chromatograph Derivatisation

استخدم كروماتوغرافيا الغاز / قياس الطيف الكتلي (GC / MS)، بأسترة عينات المتجزئات (الحامضية والقاعدية والمتعادلة) عن طريق إذابة في خمس قطرات من كل من البيريدين pyridine وخليط من N، O-bis (ثلاثي ميثيل سيليل trimethylsilyl) ثلاثي فلورو أسيتاميد trifluoroacetamide وثلاثي ميثيلي ميثيل كلورو سيلان trimethylchlorosilane (BSTFA) (99:1 حجم / حجم)، تم ترك المحلول في أنبوب صمامي مغلق لمدة 5 أيام في درجة حرارة الغرفة في الظلام. يُخر المذيب بعد ذلك في الفراغ وتم إضافة بيريدين (0.3 مل) إلى المستخلصات لإذابة العينة [66].

1.8.2. أدوات وشروط كروماتوغرافيا الغاز -مطياف الكتلة
حللت العينات المشتقة باستخدام نظام كمبيوتر GC-MS. كان كروماتوجراف الغاز (GC) باستخدام Hewlett-Packard 5890 Series II المزودة بعمود شعري سيليكاً مدمج بسلك 25 م $\times$ 0.32 مم $\times$ 0.52 مم. سمك الفيلم DB-5. تم ضبط درجة حرارة المصدر عند 50 درجة مئوية، وتأخير المذيب سيكون 1.5 دقيقة. ستكون درجة حرارة خط النقل المتصل بـ GC مع MS 280 درجة مئوية [67]. برمجت درجة حرارة العمود من 120 درجة مئوية / دقيقة واحدة وترفع إلى 260 درجة مئوية عند 10 درجة مئوية لكل دقيقة لمدة 8 دقائق. تم استخدام الهيليوم عالي النقاء بسرعة خطية 38 سم s-1 كغاز حامل، وكانت درجة حرارة وواجهة الحاقن 270 درجة مئوية. كان حجم العينة المحقونة كان 1.0 مل. مطياف الكتلة (MS) كان عبارة عن VG Trio-2 مع تأين إلكتروني (EI) وضع المسح (1-550 amu sec-1) بجهد مؤين (70ev) [68].



شكل 2. الخصائص المزرعية لأحد العزلات النقية لفطر *Trichoderma* على الوسط المغذي PDA



شكل 3. اختبار التضاد الفطري الحيوي المزدوج لفطر *Trichoderma* على فطر *Fusarium oxysporum*. (A) تقابل الفطر الممرض (1) والفطر المضاد (2) على نفس طبق PDA في اليوم السادس من التحضين (B) وجود الفطر الممرض (الشاهد) في غياب الفطر المضاد على طبق PDA في اليوم السادس من التحضين

2.3. عزل الفطر الممرض *Fusarium oxysporum*

عُزل الفطر الممرض من الجذور وقاعدة الساق لشتلات نبات الزيتون المصابة وتم الحصول على عزله واحدة من فطر *F. oxysporum* وتم التعرف عليهم على مستوى النوع بواسطة الخصائص المظهرية والمجهريّة، كان شكل المستعمرة لفطر *F. oxysporum* قطني أبيض في بداية النمو ثم تحول إلى اللون الوردي تدريجياً، ذات سطح سفلي وردي داكن (شكل 4)، أما الخصائص المجهريّة كانت الأبواغ الكونيدية الكبيرة ذات شكل هلالى ومقسمة بحواجز عرضية 2-3، وأما الأبواغ الكونيدية الصغيرة كروية الشكل وغير مقسمة بحواجز عرضية، وكان الحامل الكونيدي ممدود ومتفرع بشكل قليل.



شكل 4. عزلة نقية لفطر *Fusarium oxysporum*

2.8.2. تحديد المركبات المضادة للفطريات بواسطة GC / MS

حددت المركبات المفصولة كروماتوغرافياً عن طريق البحث في قاعدة بيانات المكتبة الطيفية. وتم إجراء التحديد النهائي للمركبات في عينات الاستخراج عن طريق مطابقة أوقات استبقاء GC وأطياف الكتلة مع المركبات المعروفة في مكتبة المستخدم. اعتمد تحديد المركبات على 90٪ من التشابه بين أطياف MS للمركبات غير المعروفة والمرجعية في مكتبة أطياف MS [69].

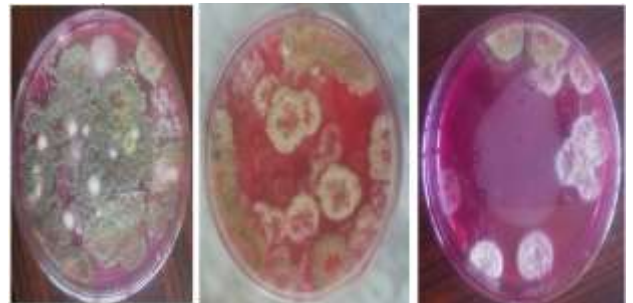
9.2. تصميم التجارب والتحليل الإحصائي:

الإحصائي الوصفي والتحليلي من أجل تحليل البيانات واختبار الفرضيات وذلك باستخدام برنامج الحزم الإحصائية للعلوم والاجتماعية (SPSS V25) (IBM, SPSS Inc.)، وتم باستخدام اختبار تحليل التباين الأحادي One Way ANOVA لاختبار الفروق المعنوية بين المعاملات.

3. النتائج والمناقشة

1.3. عزل فطر *Trichoderma*

عُزل الفطر من التربة الملتصقة بجذور شتلات نبات الزيتون بطريقة التخفيف المتسلسل على الوسط الانتقائي (شكل 1)، وتم الحصول على 11 عزلات بناءً على خصائص المزرعة وتم تعريفها على مستوى النوع بواسطة الخصائص المظهرية (شكل 2)، والخصائص المجهرية (شكل الكونيديا *Conidia shape*، شكل الذنبيات *Phialides*، خصائص الحامل الكونيدي، اللون المعاكس للمستعمرات و شكل ولون المستعمرات. اُختبرت على الوسط المغذي دكستروز آجار وأظهرت 8 عزلات فقط فاعلية في اختبار التضاد في المختبر (شكل 3)، وهي *T. viridi* رمز لها (T1)، *T. koningiopsis* رمز لها (T2)، *T. reesei* رمز لها (T3)، *T. viride* رمز لها (T4)، *T. harzianum* رمز لها (T5)، *Trichoderma sp.* لم تعرف لمستوى النوع رمز لها (T6)، *T. viride* رمز لها (T7)، *T. aureoviride* رمز لها (T8).

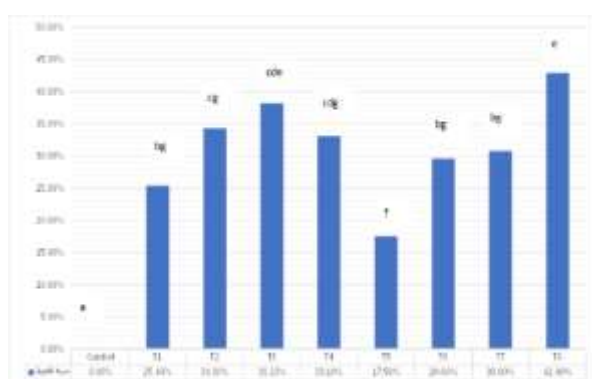


شكل 1. عزل فطر *Trichoderma* على الوسط الانتقائي (TSM) باستخدام تخفيفات متسلسلة مختلفة.

المركبات المتطابرة لفطر *Trichoderma harzianum* أظهرت تثبيط قوي وصل الى 79.25% مقارنة بالأنواع الأخرى.



شكل 6. اختبار التضاد الحيوي للمركبات المتطابرة بطريقة الأطباق المقلوبة لعزلات فطر *Trichoderma* على تثبيط فطر *Fusarium oxysporum* طبق معاملة الشاهد اليوم الثالث من التحضين. (B) طبق المعاملة الفطر المضاد في وجود الفطر الممرض في اليوم الثالث من التحضين



شكل 7. متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على نسبة تثبيط نمو فطر *Fusarium oxysporum* الفروقات المعنوية بين العزلات، المشاركة في حرف أو أكثر يعني عدم وجود فروقات معنوية.

F test = 25.303 P = 0.000

5.3. اختبار التضاد الحيوي للمركبات غير المتطابرة بطريقة غشاء

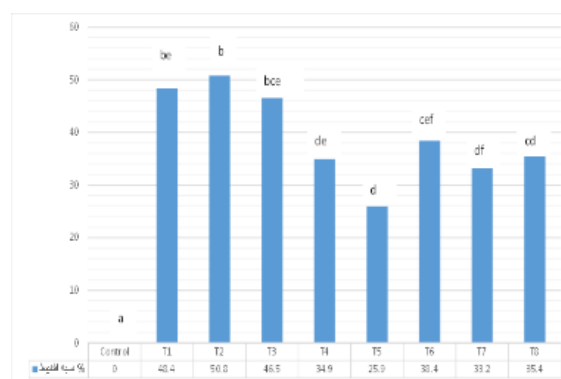
السلفان لعزلات فطر *Trichoderma* على فطر *F. oxysporum* أوضحت نتائج تأثير نوع العزلة للمركبات غير المتطابرة (شكل 8)، أن 8 عزلات فطر *Trichoderma* لها القدرة على تثبيط فطر *F. oxysporum* وكانت العزلات T2، T3، وT8، هي أفضل العزلات في التثبيط ولا توجد فروقات معنوية بينهم وكانت T8 هي الأفضل نسبياً بمتوسط 2.12 ونسبة مئوية 54.6% وتليها العزلة T3 بمتوسط 2.20 ونسبة مئوية 43.6% و T2 بمتوسط 2.28 ونسبة مئوية 41.5% مقارنة بالشاهد الذي كان بمتوسط 3.90 ونسبة مئوية 0.0% وهذا يتفق مع الدراسة التي قام بها Chatterjee و Chakrabarty [73]. إن الأنواع *T. viride*، *T. hamatum*، *T. reese*، *T. harzianum* و *T. lignorum* لها قدرة عالية في تثبيط نمو فطر *F. solani* بنسبة تصل إلى 100% وأشار أن المركبات غير المتطابرة لها تأثير أفضل من المركبات المتطابرة في تثبيط نمو العامل الممرض.

أظهرت النتائج أن العزلة T3 هي أفضل العزلات في جميع الاختبارات السابقة التي تم إجراؤها وبناء على ذلك استخدمت هذه العزلة في اختبار

3.3. اختبار التضاد الحيوي المزدوج لعزلات فطر *Trichoderma* على

فطر *Fusarium oxysporum*

أوضحت النتائج، أن 8 عزلات لفطر *Trichoderma* لها القدرة على تثبيط فطر *F. oxysporum* (الشكل 5) وكانت العزلات T1، T2 و T3 هي أفضل العزلات في التثبيط ولا توجد فروقات معنوية بينهم وكانت T2 بمتوسط 1.82 ونسبة مئوية 50.8% وتليها العزلة T1 بمتوسط 1.91 ونسبة مئوية 48.4% ثم T3 بمتوسط 1.98 ونسبة مئوية 46.5% مقارنة بالشاهد الذي كان بمتوسط 3.70 ونسبة مئوية 0.0%. هذا يتفق مع الدراسة التي قام بها Modrzewska وآخرون [70]، التي لخص فيها أن نسبة التثبيط لفطر *F. oxysporum* كانت من 24 إلى 66% وذلك باختلاف نوع العزلة لفطر *Trichoderma*، ويتوافق مع الدراسة التي قام بها Gezgin وآخرون [71] والتي أظهرت كلا النوعين المختبرين لفطر *Trichoderma* (*T. citrinoviride* و *T. atroviride*) لم تكن هناك فروقات ذات دلالة إحصائية.



شكل 5. متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على نسبة تثبيط نمو فطر *Fusarium oxysporum*

الفروقات المعنوية بين العزلات، المشاركة في حرف أو أكثر يعني عدم وجود فروقات معنوية.

F test = 13.672 P = 0.000

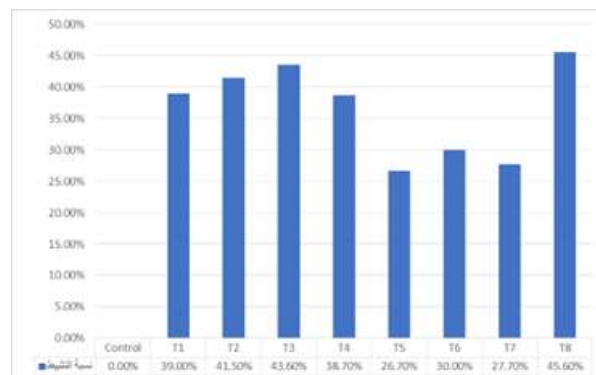
4.3. اختبار التضاد الحيوي للمركبات المتطابرة بطريقة الأطباق المقلوبة

لعزلات فطر *Trichoderma* على فطر *Fusarium oxysporum*

أوضحت النتائج تأثير نوع العزلة لاختبار الأطباق المقلوبة (شكل 6)، أن 8 عزلات لفطر *Trichoderma* لها القدرة على تثبيط فطر *F. oxysporum* وكانت العزلة T8 هي أفضل العزلات في التثبيط بمتوسط 1.93 وبنسبة مئوية 42.9% مقارنة بالشاهد الذي كان بمتوسط 3.38 وبنسبة مئوية 0.0% مع فروقات معنوية بينها وبين باقي العزلات الأخرى باستثناء العزلة T3 التي كانت بمتوسط 2.09 وبنسبة مئوية 38.2% مقارنة بالشاهد بينما كانت العزلة T5 هي أقل العزلات في التثبيط بمتوسط 2.79 وبنسبة مئوية 17.5% مقارنة بالشاهد (شكل 7)، وهذا يتفق مع الدراسة التي قام بها Kumar وآخرون [72]. التي أشار فيها إلى أن

رئيسي والذي أشارت الدراسات ان له خواص مضادة للفطريات، يليه المركب Dodecane والذي يعد من الأحماض الدهنية ذات النشاط البيولوجي بنسبة 36.85%. هذا المركب سبق الإشارة إلى دوره الفعال كمضاد ميكروبي جيد. سجلت الدراسات السابقة أن بعض المركبات التي تم تعريفها في المستخلص المتحصل عليه من فطر *Trichoderma* أنها تمتلك نشاطاً حيويًا مضاداً للفطريات (جدول 2) والتي أشارت إليه العديد من الدراسات السابقة، إلى فعالية بعضها كمضادات للفطريات أو كعوامل مضادة للميكروبات كما سجلت مشتقات البنزول مركبتان نشاط كمضاد ميكروبي ومضاد فطري من خلال الدراسة البحثية التي نشرت بواسطة (Azam و Suresh [74])، وفي الدراسة التي قام بها Lens وآخرون [75]، أن مركب (Butyl acetate) الذي تم إنتاجه بواسطة *T. atroviride* و *T. asperellum* له نشاط ضد الفطريات البيضية، من المركبات الأخرى للمضادات الفطرية الممرضة للنبات والإنسان الذي تم تعريفه في هذا البحث هو مركب (Dodecane) كما أشار Niazi وآخرون [76]، وفي دراسة أخرى قام بها Pavirhra و Lalitha [77]، أن لنفس هذا المركب فاعلية ضد *F. oxysporum* وتم الحصول عليه من *T. harzianum* و *T. Viride*. أظهرت بعض الدراسات أن مركب (3,6-Dimethyldecane) أن له فاعلية ضد الفطريات الممرضة للنبات مثل *F. oxysporum* وله فاعلية أيضا ضد البكتيريا الممرضة للنبات كما في الدراسة التي قام بها Kumari وآخرون [78]، وأشار الباحث Amrati وآخرون [79]، أن مركب Benzoic acid, 4-methyl-2-trimethylsilyloxy-, trimethylsilyl ester له نشاط حيوي ضد الفطريات والبكتيريا عدوى المستشفيات.

قدرتها على إنتاج المركبات المضادة للفطريات، وتم استخلاص وتعريف مستقلبها الأيضية الثانوية باستخدام جهاز التحليل الكروماتوغرافي الغازي-مطياف الكتلة GC/MS.



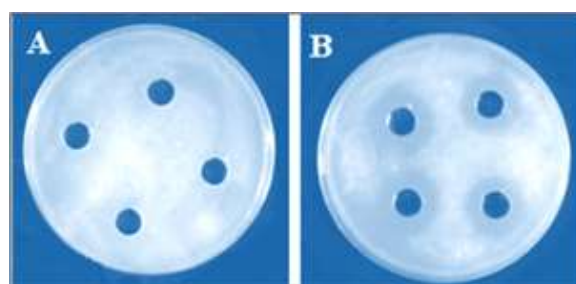
شكل 8. متوسط تأثير عزلات فطر *Trichoderma* على نسبة تثبيط نمو فطر *Fusarium oxysporum* الفروقات المعنوية بين العزلات، المشاركة في حرف أو أكثر يعني عدم وجود فروقات معنوية.

F test = 67.187 P = 0.000

6.3. تعريف المركبات المضادة للفطريات باستخدام جهاز التحليل

الكروماتوغرافي الغازي -مطياف الكتلة GC/MS

أظهرت نتائج هذا الاختبار باستخدام المذيب العضوي ثنائي إيثيل الإيثر أن المستخلصات الحامضية كانت أكثر فاعلية في نشاطها المضاد للفطريات من المستخلصات القاعدية والمتعادلة في اختبار الانتشار في الوسط المغذي آجار دكستروز البطاطس مقارنة بالشاهد (مذيب ثنائي ميثيل سلفوكسيد) (شكل 9)، وعلى أساس هذا الاختبار تم تعريف المستخلصات للشق الحامضي فقط بواسطة جهاز GC / MS باستخدام أوساط مغذية مختلفة ومعرفة تأثير مكونات هذا الأوساط في إنتاج المضادات الفطرية.



شكل 9. تثبيط نمو ابواغ فطر *Fusarium oxysporum* باستخدام طريقة الانتشار في الآجار (A) الشاهد، (B) المعاملة بالمستخلصات (الشق الحمضي)

7.3. مضادات الفطريات المتعرف عليها في وسط مرق دكستروز البطاطس للشق الحامضي

أوضحت النتائج، أن النواتج الثانوية الموجودة في مستخلص *Trichoderma* النامية في وسط مرق دكستروز البطاطس (جدول 1)، احتوت على 21 مركباً عُرِفَتْ بواسطة جهاز Gas spectrometry chromatography mass، كما بينت النتائج أن مركب Phenylethyl Alcohol كانت نسبته 38.85% من المحتوى الكلي وصنف كمركب

جدول 1. تعريف المركبات المضادة للفطريات باستخدام GC- MS

S/N	Compound	RI ^a	LRI ^b	Identification method ^c	
1.	α - Pinene	937	939	0.43	RI, MS, STD
2.	Butyl acetate	804	805	1.08	RI, MS, STD
3.	benzyl mercaptan	1067	1066	11.44	RI, MS, STD
4.	Methyl N-hydroxybenzenecarboximidoate	2271	2270	0.87	RI, MS, STD
5.	1,2,3-Trimethylbenzene	1016	1014	0.52	RI, MS, STD
6.	psi.-Cumene	989	988	0.53	RI, MS, STD
7.	4-Methyldecane	1061	1062	0.36	RI, MS, STD
8.	1-(2-Methoxypropoxy)-2-propanol	1540	1541	1.19	RI, MS, STD
9.	Benzyl alcohol	1003	1005	1.3	RI, MS, STD
10.	Sulfide, sec-butyl cyclohexyl	1266	1265	0.73	RI, MS, STD
11.	2,5-Dimethylbenzaldehyde	1682	1680	0.51	RI, MS, STD
12.	α -Terpineol	1189	1186	0.91	RI, MS, STD
13.	Dodecane	1260	1259	36.85	RI, MS
14.	3,6-Dimethyldecane	1130	1129	0.98	RI, MS
15.	Phenylethyl Alcohol	1908	1906	38.85	RI, MS
16.	Dimethyl hexanedioate	1223	1223	0.46	RI, MS
17.	Palmitic acid	1952	1950	1.01	RI, MS, STD
18.	5-Ethyl-4-tridecanone	1779	1784	0.46	RI, MS, STD
19.	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	1587	1591	0.65	RI, MS
20.	Benzoic acid, 4-methyl-2-trimethylsilyloxy-, trimethylsilyl ester	2505	2507	0.31	RI, MS
21.	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl ester	1448	1445	0.56	RI, MS
Total		-	-	100	-

(RI^a) retention indices: دلائل الإحتجاز المحسوبة على عمود DB-5 باستخدام الألكانات القياسية
(LRI^b) linear retention indices: دلائل الإحتجاز المسجلة بالنسبة للمستخلص الذي تم قياسه.
• ^c المركبات المفصلة تم التأكد منها بالمقارنة مع دلائل الإحتجاز والطيف الكتلي للمركبات الأصلية من خلال بيانات مكتبة أطيف الكتلة.

جدول 2. المركبات المتحصل عليها من الوسط المغذي لمرق دكستروز البطاطس التي أشارت الدراسات إلى فعاليتها

المركب	المصدر (الكائن)	النشاط	المراجع
alpha-Pinene	<i>Trichoderma asperellum</i>	تأثيرات قوية مضادة للالتهابات (Antimicrobial)	[80]
		مضاد لفطر <i>Alternaria solani</i>	[81]
Butyl acetate	<i>T. atroviride</i> و <i>T. asperellum</i>	ضد الفطريات البيضية (Antifungal)	[75]
Methyl N-hydroxybenzenecarboximidoate	<i>Trichoderma triandra</i>	استخدامات الصيدلانية (Antimicrobial)	[82]
α -Terpineol	<i>Melaleuca alternifolia</i>	(ضد الفطريات) <i>Aspergillus ochraceus</i> و <i>Penicillium italicum</i>	[83]
Dodecane	<i>P. brasilianum</i> و <i>A. clavatonanicus</i>	ضد الفطريات الممرضة للنبات والانسان	[76]
	<i>T. viride</i> و <i>T. harzianum</i>	مضاد لفطر <i>Fusarium oxysporum</i>	[77]
3,6-Dimethyldecane	<i>Chaetomium globosum</i>	ضد الفطريات الممرضة للنبات تشمل <i>F. oxysporum</i> وكذلك البكتيريا الممرضة للنبات	[78]
Phenylethyl Alcohol	<i>Kloeckera apiculate</i>	نشاط واسع مضاد للفطريات <i>Botrytis cinerea</i> و <i>Penicillium molds</i>	[84]
Benzoic acid, 4-methyl-2-trimethylsilyloxy-, trimethylsilyl ester	<i>Caralluma europaea</i>	مضاد فطريات وبكتيريا عدوى المستشفيات	[79]
Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl ester	<i>Trichoderma spp.</i>	مضاد للفطر <i>Penicillium expansum</i>	[86-85]

4. الخلاصة:

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تعزيز المعرفة والفهم لدور نواتج الايض الثانوية وتأثيرها على تثبيط الفطريات الممرضة للنبات. ركزت الاختبارات على مضادات الفطريات الطبيعية لفطر *Trichoderma* المعزولة من التربة وطرق استخلاصها وتطبيقات التعريف باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا. كان من المهم التركيز على دور الفطر المضاد ضد أهم مسببات الأمراض الفطرية وهو فطر *F. oxysporum*، وذلك لما هذا من أهمية كبيرة نتيجة للخسائر الاقتصادية الكبيرة التي قد يسببها على أشجار الزيتون وغيرها من النباتات الأخرى. وعلى هذا الأساس تم اختبار قدرة نشاط فطر *Trichoderma* في تثبيط نمو هذا الفطر. واحدة من الآليات الأساسية في مكافحة الحيوية لأمراض النبات هي إنتاج المستقبلات المضادة للفطريات. أجريت الاختبارات لعزل وتوصيف المستقبلات المضادة للفطريات التي ينتجها فطر *Trichoderma* وكانت النتائج ايجابية جدا تعزز دور مكافحة الحيوية للحد من استخدام المبيدات الكيميائية. ربما يكون مستوى مكافحة الذي تم تحقيقه في هذه الدراسة مشابها لمستوى مبيدات الفطريات الكيميائية المستخدمة في دراسات مختلفة. لذلك، ينبغي إجراء المزيد من التجارب الحقلية للتأكد من فعالية هذه المستقبلات كعلاجات ضد مسببات أمراض الذبول على أشجار الزيتون. يمكن أيضاً اختبار العزلات لفطر *Trichoderma* المتحصل عليها في هذه الدراسة ضد مسببات الأمراض الشائعة الأخرى لتحديد طيف نشاطها.

يجب بعد هذه الدراسة الجزئية حول توصيف المستقبلات المضادة للفطريات، إجراء دراسات أكثر تفصيلاً لتنقية التركيب الكيميائي للجزء النشط المسؤول على التثبيط وتوصيفه بالكامل.

5. المراجع:

1. Velásquez, A.C., Castroverde, C.D.M. and He, S.Y. (2018). Plant-Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. *Curr. Biol.* 28, 619–R634.
2. Prange, A., Birzele, B., Krämer, J., Meier, A., Modrow, H. and Köhler, P. (2005). *Fusarium*-inoculated wheat: Deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time. *Food Control.* 16, 739-45.
3. Trabelsi, R., Sellami, H., Gharbi, Y., Krid, S., Cheffi, M., Kammoun, S., Dammak, M., Mseddi, A., Gdoura, R. and Triki, M. A. (2017). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with olive trees dieback in Tunisia. 7(28), 2-9.
4. Woloshuk, C. P. and Shim, W. B. (2013). Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 94–109.
5. Parry, D.W. (1990) The incidence of *Fusarium* spp. in stem bases of selected crops of winter wheat in the Midlands, UK. *Plant pathol.* 39, 619-622.
6. Hardwick, N. V., Jones, D. R. and Slough, J. E. (2001). Factors affecting diseases of winter wheat in England and Wales, 1989-98. *Plant Pathol.* 50, 453-462.
7. Gajera, H., Domadiya, R., Patel, S., Kapopara, M. and Golakiya, B. (2013). Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system. A review. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* 1, 133–142.
8. Persoon, C. H. (1794). Neuer Versuch einer systematischen Einteilung der Schwämme. *Racodium Römer's Neues Magazin der Botanik.* 1, 123.
9. Atehnkeng, J. P. S., Ojiambo, T., Ikotum, R. A., Sikora, P. J., Cotty and Bandyopadhyay, R. (2008). Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. *Food Additives & Contaminants Part A.*, 25, 1266-1273
10. Koumoutsis, A. X. H., Chen, A., Henne, H., Liesegang, G., Hitzeroth, P., Franhe, J., Vater and Borris, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloli* quefaciens strain FZB42. *J. Bacteriol.*, 186. 1084-1096.
11. Leelavathi, M.S., Vani, L. and Reena, P. (2014). Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(1), 96-103.
12. Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol Res.* 100, 923-935.
13. Yaqub, F. and Shahzad, S. (2008). Effect of seed pelleting with *Trichoderma* spp., and *Gliocladium virens* on growth and mugbean by colonization of roots of sunflower *Sclerotium rolfsii*. *Pak. J. Bot.*, 40, 947-963.
14. Pandya, J. R., Sabalpara, A. N. and Chawda, S. K. (2011). *Trichoderma*: A particular weapon for biological control of phytopathogens. *J. Agric. Technol.* 7, 1187-1191.

25. Shah, P., Abid1, M., Abbas, A., Basheer, N., Sheikh, A. H., Jabeen, N. and Sitara, U. (2020). Screening of *Trichoderma viride* as a Bio-Control Agent Against Different Soil-Borne Infectious and Phytopathogenic Fungi. 17(2), 405-410.
26. Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y. and Valero, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control Biochem. Eng. J., 30, 1-20.
27. Saleh, R. M., Kabli, S. A., Al-Garni, S. M and Mohamed, S. A. (2011). Screening and production of antibacterial compound from *Trichoderma* spp. against human-pathogenic bacteria. African Journal of Microbiology Research Vol. 5(13), 1619-1628.
28. Mukhtar, T., Tariq-Khan, M. and Aslam, M. N. (2021). Bioefficacy of *Trichoderma* Species Against Javanese Root-Knot Nematode, *Meloidogyne javanica*, in Green Gram.
29. Korpi, A., Jarnberg, J. and Pasanen, A.L. (2009). Microbial volatile organic compounds; Critical Reviews in Toxi- cology, 39, 139–193.
30. Schnurer, J., Olsson, J. and Borjesson, T. (1999). Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage. Fungal Genetics and Biology, 27, 209–217.
31. Yassin, M. T., Mostafa, A. A., and Al-Askar A. A. (2022). *In vitro* antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against fungal pathogens causing black point disease of wheat. Journal of Taibah University for Science. 16, (1) 57-65.
32. Kohl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W.J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. Front Plant Sci. 10,845.
33. Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. and Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International microbiology. 7, 249-260.
34. Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases. The history and evolutions of current concepts. Plant Disease. 87(1), 4-10.
35. Sobowale, A. A., Uzoma, L. C., Aduramigba-Modupe, A. O., Bamkefa, B. A. (2022). Fungitoxicity of *Trichoderma longibrachiatum* (Rifai) Metabolites against *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus*
15. Tripathi, P., Singh, P. C., Mishra, A., Puneet, S., Chauhan, Dwivedi, S., Thakur, R., Deo, B. and Tripathi, R. (2013). *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental cleanup. Clean Technol. Environ. Policy, 15, 541-550.
16. Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mukherjee, M. and Schmoll, M. (2013). *Trichoderma* in agriculture, industry, and medicine: an overview. p. 1–9. In: “*Trichoderma* biology and applications” (P.K. Mukherjee, B.A. Horwitz, U.S. Singh, M. Mukherjee, M. Schmoll, eds.). CAB International, Boston, USA, 327 pp.
17. Schuster, A. and Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology 87(3), 787–799.
18. Metcalf, D. A. and Wilson, C. R. (2001). The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. Plant Pathol. 50 (2), 249–257.
19. Perelló, A., Mónaco, C., Simón, M, R., Sisterna, M. and Bello, G. D. (2003). Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. Crop Prot 22 (9), 1099–1106.
20. Copping, L.G. (2001) The Biopesticide Manual. British Crop Protection Council, Surrey.
21. Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perception derived from research on *Trichoderma harezianum* strain T-22. Plant Disease Report.84, 4, 377-393.
22. Kushwaha, M. and Verma, A. K. (2014). Antagonistic Activity of *Trichoderma* spp., (A Bio- Control Agent) Against Isolated and Identified Plant Pathogens. 1(1), 1-6.
23. Arumugam, K., Ramalingam, P. and Appu, M. (2013). Isolation of *Trichoderma Viride* and *Pseudomonas fluorescens* organism from soil and their treatment against rice pathogens. 3(6), 77-81.
24. Zhi-xiang, L., Guang-ping, T., Ting, Z., Ya-qian, L., Xin-hua, W., Quan-guo, Z., Wei, S. and Jie, C. (2020). Screening of antagonistic *Trichoderma* strains and their application for controlling stalk rot in maize. Journal of Integrative Agriculture,19(1), 145–152.

45. Conrado, R., Gomes, T. C., Roque, G. S. C. and Ana Olívia De Souza, A. O. D. (2022). Overview of Bioactive Fungal Secondary Metabolites: Cytotoxic and Antimicrobial Compounds. *Antibiotics*, 11, 1-38.
46. Kucuk, C. and Kivanc, M. (2004). *In vitro* antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. *Turkish Journal of Biology*. 28, 111-115.
47. Awad, N. E., Kassem, H. A., Hamed, M. A., El-Feky, A. M., Elnaggar, M. A. A. and Mahmoud, K. (2018). Isolation and characterization of the bioactive metabolites from the soil derived fungus *Trichoderma viride*. *Mycology* 9, 70–80.
48. Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., Santos-Villalobos, S. D. L., Parra-Cota, F. I., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Fadji, A. F., Hyder, S. and Babalola, O. O. (2023). *Trichoderma* Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases-A Review. *Plants*. 12, 1-35.
49. Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E. and Jaroszek-Ścisł, J. (2022). *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *Int. J. Mol. Sci.* 23(4): 23-29.
50. Zhang, J., Tang, W., Huang, Q., Li, Y., Wei, M., Jiang, L., Liu, C., Yu, X. and Zhu, H. (2022). *Trichoderma*: A treasure house of structurally diverse secondary metabolites with medicinal importance. *Front. Microbiol.* 12, 2037.
51. Elad, Y. and Chet, I. (1983). Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. *Phytoparasitica*. 11, 55–58.
52. Elad, Y., Chet, I. and Henis, Y. (1981). A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*. 9(1), 59-67.
53. Bahatnagar, H. (1986). Influence of environmental condition on antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against *Fusarium udum*. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*. 26, 58-63.
54. Al-Jedabi, A. A. (2009). Biological control of *Fusarium* root-rot of sorghum. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 5, 465-473.
36. Stracquadanio, C., Quiles, J. M., Meca, G. and Cacciola, S. O. (2020). Antifungal Activity of Bioactive Metabolites Produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in Liquid Medium. *J Fungi (Basel)*. 6(4), 263.
37. Singh, H. B., Singh, B. N., Singh, S. P., Singh, S. R. and Sarma, B. K. (2009). Biological control of plant diseases: status and future prospects. In: Johri, J.K. (Ed.), *Recent Advances in Biopesticides: Biotechnological Applications*. New India Pub, New Delhi, p. 32.
38. Vinale, F., Marra, R. and Ruocco, M. (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol. J.* 8, 127–139.
39. Gonzalez, M.F., Galarza L., Valdez L. L. and Quizhpe, G. M. (2023). Antifungal activity of metabolites from *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum*. 8.
40. Rao Y, Zeng L, Jiang H, Mei L, Wang Y. (2022). *Trichoderma atroviride* LZ42 releases volatile organic compounds promoting plant growth and suppressing *Fusarium* wilt disease in tomato seedlings. *BMC Microbiol.* 22 (1):88.
41. Cardoza, R., Hermosa, M., Vizcaino, J., Sanz, L., Monte, E. and Gutiérrez, S. (2005). Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. In: *Microorganisms for Industrial Enzymes and Biocontrol*. Research Signpost 37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India
42. Khan, R. A., Najeeb, S., Hussain, S., Xie, B., and Li, Y. (2020). Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. *Microorganisms*. 8,817.
43. Ghosh, S. K., Banerjee, S. and Sengupta, C. (2017). Bioassay, characterization, and estimation of siderophores from some important antagonistic fungi. *J. Biopest.* 10(2), 105-112.
44. Mannai, S. and M’Hamdi, N. B. (2022). *In vitro* and in planta potential effect of some indigenous antagonists against *Fusarium* and pythiaceae species associated with peach seedlings decline. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 32 (60), 1-10.

66. Dubey, S. S., Suresh, M. and Singh, B. (2007). Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* for integrated management of chickpea wilt. *Biol. Control*. 40, 118-127.
67. Faruk, M. I., Rahman, M. L. and Bari, M. A., (2002). Management of seedling disease of cabbage through *Trichoderma harzianum* amendment in seedbed. *Bangl. J. Plant Pathol*. 18, 49-53.
68. Hajieghrari, B., Torabi-Giglou, M., Mohammadi, M. R. and Davari, M. (2008). Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology*. 967-972.
69. Monte, E., (2001). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int. Microb.* 4, 1-4.
70. Modrzewska, M., Błaszczuk, L., Stępień, L., Urbaniak, M., Waśkiewicz, A., Yoshinari, T. and Bryła, M. (2022). *Trichoderma* versus *Fusarium* Inhibition of Pathogen Growth and Mycotoxin Biosynthesis. 1-13.
71. Gezgin Y., Gül, D.M., Şenşatar, S.S., Kara, C.U., Sargin, S., and Sukan, F.V. (2020). Evaluation of *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma citrinoviride* growth profiles and their potentials as biocontrol agent and biofertilizer. *Turkish J. Biochem.* 2020; 45(2):163-175.
72. Kumar, M., Kumar, V., Rana, M. and Srivastava, S. (2019). Effect of Volatile and Non-Volatile Compounds of *Trichoderma* spp. Against *Fusarium* Isolates Causing Chickpea Wilt in Punjab. 19(1), 159-162.
73. Chakraborty, M. R. and Chatterjee, N. C. (2008). Control of *Fusarium* wilt of *Solanum melongena* by *Trichoderma* spp. 52(3), 582-586.
74. Azam, M. A. and Suresh, B. (2012). Biological Activities of 2-Mercaptobenzothiazole Derivatives: A Review. *Scientia Pharmaceutica*. 80(4), 789-824.
75. Lens, C., Malet, G. and Cupferman, S. (2016). Antimicrobial activity of Butyl acetate, Ethyl acetate and Isopropyl alcohol on undesirable microorganisms in cosmetic products. *International journal of cosmetic science*, 38(5), 476-480.
55. Pettitt, T. R. and Parry, D. W. (1993). Improved estimation of the incidence of *Microdochium nivale* in winter wheat stems in England and Wales, during 1992, by use of benomyl agar. *Mycol. Res.* 97, 1172-1174.
56. Khalid, I.Y. and Sahi, A. N (2007). In vitro biological control of *Fusarium oxysporum* causing wilt in *Capsicum annuum*. *Pakistan. J. Bot.* 5(2), 85-88.
57. Vincent, J. M. (1947). Distortion of Fungal hyphae in the presence of certain inhibitors. *Nature*. 150, 850.
58. Dennis, C. and Webster, J. (1971b). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I, production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*. 57, 25-39.
59. Watts, R., Dahiya, J. and Chaudhary, K. (1988). Isolation and Characterization of a New Antifungal Metabolite of *Trichoderma reesei*. *Plant and Soil*. 107, 81-84.
60. Arunodhayam, K., Eswara, N. P. Reddy and Madhuri, V. (2014). Determination of the *in vitro* effect of *Trichoderma harzianum* on Phytopathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Current Biotica*. 7, 343-358.
61. Altinok, H. H. (2009). In vitro production of fumonisin B1 and B2 by *Fusarium moniliforme* and the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Annals of Microbiology*. 59, 509-516.
62. Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q. and Steinberg, C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*. 184, 529-544.
63. Dennis, C. and Webster, J. (1971a). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*, II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*. 57, 363-369.
64. Bell, D. K., Wells H. D., and Markham C. R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal pathogens. *Phytopathology*. 72, 379-382.
65. Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA.

- of *Tiliacora triandra*. Hindawi Journal of Chemistry Volume 2022, Article ID 8754528, 16 pages.
83. Kong, Q., Zhang, L., An, P., Qi, J., Yu, X., Lu, J., and Ren, X. (2019). Antifungal mechanisms of α -terpineol and terpene-4-ol as the critical components of *Melaleuca alternifolia* oil in the inhibition of rot disease caused by *Aspergillus ochraceus* in postharvest grapes. *Journal of Applied Microbiology*, 126(4), 1161–1174.
 84. Zou, X., Wei, Y., Jiang, S., Xu, F., Wang, H., Zhan, P. and Shao, X. (2022). ROS Stress and Cell Membrane Disruption are the Main Antifungal Mechanisms of 2-Phenylethanol against *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* 70(45), 14468-14479.
 85. Bruisson, S., Alfiky, A., Haridon, F. L. and Weisskopf, L. (2023) A new system to study directional volatile-mediated interactions reveals the ability of fungi to specifically react to other fungal volatiles *Frontiers in Ecology and Evolution* (IF 4.493).
 86. Wang Y, Feng K, Yang H, Yuan, Y. and Yue, T. (2018). Antifungal mechanism of cinnamaldehyde and citral combination against: *Penicillium expansum* based on FT-IR fingerprint, plasma membrane, oxidative stress, and volatile profile. *RSC Adv.* 8, 5806–5815.
 76. Niazi, S. K., Basavarajappa, D. S., Kumaraswamy, H. H., Bepari, A., Hiremath, H., Nagaraja, S. K., Rudrappa, M., Hugar, A., Cordero, M. A. W. and Nayaka, S. (2023). GC-MS Based Characterization, Antibacterial, Antifungal and Anti-Oncogenic Activity of Ethyl Acetate Extract of *Aspergillus niger* Strain AK-6 Isolated from Rhizospheric Soil. *CIMB*, 45(5), 3733-3756.
 77. Pavirhra, R. and Lalitha, S. (2020). Tetradeceane producing biocontrol agent, *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Agricultural Technology*, 16(6), 1475-1492.
 78. Kumari, S., Attri, C., Sharma, R., Kulshreshtha, S., Benali, T., Bouyahya, A., Güreş, E. S. and Hindawi, J. S-R. (2022). GC-MS Analysis, Antioxidant and Antifungal Studies of Different Extracts of *Chaetomium globosum* Isolated from *Urginea indica* BioMed Research International. 12 pages.
 79. Amrati, F. E., Bourhia, M., Saghrouchni, H., Slighoua, M., Grafov, A., Ullah, R., Ezzeldin, E., Mostafa, G. A., Bari, A., Ibenmoussa, S., Bousta, D., Barros, L., Capasso, R. and Mannelli, L. D. C. (2021). *Caralluma europaea* (Guss.) N.E.Br.: Anti-Inflammatory, Antifungal, and Antibacterial Activities against Nosocomial Antibiotic-Resistant Microbes of Chemically Characterized Fractions. *Molecules* 26(3), 636.
 80. Agbessenou, A., Akutse, K. S., Yusuf, A. A., Khamis, F. M. (2022) The endophyte *Trichoderma asperellum* M2RT4 induces the systemic release of methyl salicylate and (Z)-jasmones in tomato plant affecting host location and herbivory of *Tuta absoluta*. *Front Plant Sci.* 13.
 81. Marei, G. I. K., and Abdelgaleil, S. A. M. (2018). Antifungal Potential and Biochemical Effects of Monoterpenes and Phenylpropenes on Plant Pathogenic Fungi, *Plant Protect. Sci.* 54(1), 9–16.
 82. Das, G., Gouda, S., Kerry, R.G., Cortes, H., Prado-Audelo, M. L. D., Leyva-Gomez, G., Fokou, P. V. T., Gutierrez-Grijalva, E. P., Heredia, J. B., Shin, H-S. and Patra, J.K. (2022). Review Article Study of Traditional Uses, Extraction Procedures, Phytochemical Constituents, and Pharmacological Properties