مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (33) العدد (5) 2011
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (33) No. (5) 2011

استخدام عزلات محلية من الفطر *Trichoderma* ضد أطوار مختلفة من نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne incognita* مخبرياً

الدكتورة ندى ألوف*
الدكتورة ميساء يازجي**
رامي قسّام***

(تاريخ الإيداع 7 / 2 / 2011. قبل للنشر في 28 / 9 / 2011)

□ ملخّص □

تم تقييم فاعلية (7) عزلات محلية من الفطر *Trichoderma* ضد نيماتودا تعقد الجذور Root Knot Nematode *Meloidogyne incognita* Goeldi (RKN) مخبرياً، عزلتان منها تتبع النوع *Trichoderma longibrachiatum* Rifai و(4) عزلات تتبع للنوع *Trichoderma viride* Pers. ex s.f. Gray وعزلة واحدة تتبع النوع *Trichoderma harzianum* Rifai معزولة من تربة وجذور نباتات بندورة مصابة بنيماتودا (RKN) في ظروف الزراعة المحمية في الساحل السوري، بالمقارنة مع فاعلية المستحضر التجاري (Biocont) والذي مادته الفعالة أبواغ الفطر*Trichoderma harzianum* والمستخدم ضد أطوار نيماتودا (RKN). وقد دلت النتائج على قدرة جميع العزلات المحلية على التطفل على بعض أطوار النيماتودا (RKN). حيث بلغت النسب المئوية لتطفل الأنواع السابقة من العزلات المحلية على بيوض النيماتودا (RKN) داخل كتل البيض، (37.86%)،(37.36%) و(43.70%) على التوالي وهي أعلى من النسبة المئوية لتطفل المستحضر التجاري (26.20%) على النيماتودا المدروسة. كما ارتفعت معدلات تطفل العزلات ذاتها على بيض النيماتودا المحرر من كتل البيض والتي بلغت (71.47%)،(60.43%) و(71.25%) على التوالي مقارنةً مع المستحضر التجاري (40.20%)، ومن جهة أخرى أظهرت جميع العزلات المحلية قدرة عالية على التطفل على إناث النيماتودا حيث بلغت نسبة تطفل العزلة المحلية الأقوى *T. harzianum* (90.56%) مقارنةً مع تطفل المستحضر التجاري (63.22%)، كما ثبطت العزلة الأقوى فقس بيوض النيماتودا (RKN) حيث بلغ معدل الفقس (5.75%) وهي نسبة منخفضة جداً مقارنةً مع المستحضر التجاري والشاهد والتي بلغت (41.50%)،(51%) على التوالي.

الكلمات المفتاحية : *Meloidogyne* ، *Trichoderma* ، المكافحة البيولوجية ، الفطريات المتطفلة على النيماتودا

* **مدرس – قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية**
** **أستاذ مساعد– قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية**
*** **طالب دراسات عليا (ماجستير) – قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية**

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (33) العدد (5) 2011
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (33) No. (5) 2011

Use of Local Isolates of the Fungi *Trichoderma* against Different stages of Root-Knot Nematode *Meloidogyne Incognita* under Laboratory Conditions

Dr. Nada Allouf [*]
Dr. Maysa Yaziji [**]
Rami Kassam [***]

(Received 7 / 2 / 2011. Accepted 28 / 9 /2011)

□ ABSTRACT □

This paper evaluates the efficacy of seven local isolates of the fungi *Trichoderma* against the root-Knot nematode (RKN) *Meloidogyne incognita* Goeldi in laboratory. 2 of them belong to *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, 4 belong to *Trichoderma viride* Pers. ex s.f. Gray, and 1 to *Trichoderma harzianum* Rifai. They were isolated from (RKN) infected soil and roots of tomato under greenhouse conditions in the Syrian coast. They were compared with the efficacy of commercial product (Biocont) which contains spores of *T. harzianum* against all stages of (RKN) which infects tomato's plant.

Results showed that all local isolates had a potential virulence to parasitize some stages of (RKN). The percentage of the local isolates parasitism of *Trichoderma*, (*T.l*),(*T.v*) and (*T.h*), on eggs inside egg masses was about (37.86%),(37.36%) and (43.70%) respectively. It was higher than commercial product parasitism (26.20%) on studied nematodes. Parasitism rate of the same previous isolates on freed eggs from egg masses was (71.47%), (60.43%) and (71.25%), respectively. It was clearly higher than the commercial product parasitism (40.20%). Moreover, the whole local isolates showed high capacity of parasitism on female's nematodes: it reached in the strongest local isolate (*T.h*) to (90.56%) compared with the commercial product parasitism (63.22%). This isolate damped eggs hatching of (RKN) to (5.75%). It was very low compared with commercial product and control, which reaches (41.50%) and (51%), respectively.

Keywords: *Trichoderma*, *Meloidogyne*, Biological control, Nematophagous fungi.

[*] **Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
[**] **Associate Professor, Department of Plant Biology, Faculty of Science, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
[***] **Postgraduate Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

يُعد محصول البندورة *Lycopersicun esculentum* من أهم محاصيل الخضر اقتصادياً وأوسعها انتشاراً على المستويين العالمي والمحلي لما تمتاز ثمارها بقيمة غذائية عالية (بوراس وزملاؤه، 2005).

يُصاب هذا المحصول بالعديد من الحشرات والمسببات المرضية ومن بينها النيماتودا التي تسبب خسائر كبيرة على كمية الإنتاج ونوعيته، ويُعد مرض تعقد الجذور الذي تسببه النيماتودا التابعة للجنس *Meloidogyne* من أكثر الأمراض انتشاراً على نباتات البندورة المزروعة في البيوت البلاستيكية في سورية (البلخي وجمعة، 1989).

تنتشر نيماتودا العقد الجذرية في جميع أنحاء العالم ولاسيما في المناطق المعتدلة حرارياً حيث يتطفل هذا الجنس على أكثر من (2000) نوع نباتي فهي تتميز بالمدى العائلي الواسع (Singh and Sitaramaiah, 1994).

تزداد نسبة الخسائر التي تسببها هذه النيماتودا على محصول البندورة في المناطق الاستوائية والمعتدلة من العالم فقد وصلت في الباكستان إلى (46.2)% (Khattak, 2002 ;Zareen *et al.*, 2001). أما في المنطقة العربية فقد تم تسجيل خمسة أنواع من الجنس *Meloidogyne* على محصول البندورة في مختلف البلدان العربية وهي: *M. javanica , M. hapla , M. incognita , M. arenaria , M. ardinensis* (أبوغربية وآخرون، 2010).

أشار لامبرتي (1983) إلى أن انتشار أنواع *Meloidogyne* spp. في سورية يشكل وبدون شك مشكلة هامة حيث سُجل في دراسته ثلاثة أنواع من هذا الجنس وهي : *M. javanica* ، *M. incognita* ، *M. arenaria*. وتبين أن مكان تفشي الجنس *Meloidogyne* يكون على شكل بؤر في الحقل وأظهرت النباتات المُصابة نمواً متقزماً ومحصولاً قليلاً مما يدل على خطورة هذا الجنس على محصول البندورة في سورية. وتُشير عمليات المسح المتعلقة بنيماتودا تعقد الجذور في سورية على العائلة الباذنجانية والقرعية إلى أن الأنواع الأكثر انتشاراً هي:

M. javanica ، *M. incognita* ، *M. arenaria* . (معروف وزملاؤه، 2007)

تتميز أفراد هذا الجنس من النيماتودا بأن الإناث مستقرة في الجذور ذات شكل كمثري، وأنها تضع البيض في كيس جيلاتيني يبرز عادةً إلى سطح الجذر، ويتطور الجنين داخل البيضة ليعطي الطور اليرقي الثاني المُعدي القادر على إحداث الإصابة وذلك باختراق الجذر ليستقر ويتغذى مشكلاً موقعاً دائماً للتغذية تظهر الإصابة على شكل عقد جذرية، أما الذكور فلها شكل دودي وظيفتها تلقيح الإناث (Perry *et al.*, 2009; Kerry *et al.*, 1987).

تستخدم عادةً المبيدات النيماتودية عالمياً وبكثافة عالية للسيطرة على هذه الآفة وذلك منذ خمسينيات القرن الماضي ولكن هذا الاستخدام الخاطئ للمبيدات الكيماوية قد تراجع بشدة لما لها من خطر على البيئة والإنسان واستخدم عوضاً عنها تقنية جديدة هي الإدارة المتكاملة للآفات النيماتودية ومن أهم أساليبها استخدام الأعداء الحيوية كالفطريات والبكتريا على أن يكون الرش بالمبيدات الكيماوية كحل أخير وليس أولياً (Agrios, 2004). وقد اهتمت الدراسات الحديثة بتطبيق أسلوب المكافحة الحيوية ضد النيماتودا المتطفلة على العديد من النباتات، ولاسيما استخدام الفطريات كأعداء حيوية مثل: *Verticillium* spp. ، *Fusarium* spp. ، *Trichoderma* spp. ، *Paecilomyces* spp. ، *Dactylella* spp. ، *Arthorobotrys oligospora* .

(Stirling, 1991;Omar *et al.*, 2002 ;Mankau, 1980 ; Khan *et al.*, 2002 ; Meyer *et al.*, 2001)

تم في الهند عزل 115 عزلة فطرية تابعة لأنواع مختلفة، تبين أنها تتطفل على بيوض وإناث نيماتودا تعقد الجذور، ووجد أن 59 عزلة منها تمكنت من منع فقس البيوض بنسبة (50–90)% ومن هذه الفطريات نذكر:

Clamydospora , Trichoderma sp. *, verticillium lecanii , Paecilomyces lilacinus , Aspergillus Tamarii , Fusarium* sp. *, penicillium* sp. *, Drechslera* sp.

(Santhosh *et al.*, 2005)

يضم فطر *Trichoderma* العديد من الأنواع التي تستعمل بشكل متزايد في المكافحة الحيوية ولاسيما ضد ممرضات التربة الفطرية والنيماتودية. وهو فطر خيطي رمي ومتطفل شائع الانتشار يستطيع النمو في ظروف بيئية مختلفة ويمكن عزله وتنميته بسهولة على الأوساط المغذية (أبوعرقوب، 2000). وأكد Windham (1993) أن أهم آليات تطفل الفطر *Trichoderma* على نيماتودا تعقد الجذور هي إفرازه لأنزيم Chitinase الذي يحلل كيتين قشرة بيوض النيماتودا وكيوتيكل اليرقة Juvenile (J_2) لكي يدخل ميسيلوم الفطر إلى داخلها.
(Sahhebani and Hadavi, 2008 ;Siddiqui *et al.*, 2001 ;Windham *et al.*,1993)

تم عزل بعض أنواع هذا الفطر من كتل بيوض النيماتودا التي تصيب البندورة وذلك عند تحضينها في درجة حرارة (25 ± 2)° س وهذا يعطى أسلوباً حديثاً وآمناً في مكافحة هذه الآفة (Goswami, *et al.*, 2006).

أهمية البحث وأهدافه:

تسبب نيماتودا تعقد الجذور التابعة للجنس *Meloidogyne* مشكلة اقتصادية كبيرة، ولاسيما في البيوت البلاستيكية حيث تتوفر لها الشروط الملائمة للنمو والتكاثر طوال العام مما يزيد من انتشارها بكثافات مرتفعة، ومن هنا نجد أنه لابد من تطبيق وسائل لمكافحتها، ومن المعروف أن التوجه العالمي حالياً هو التقليل من استخدام المبيدات الكيماوية الضارة بالبيئة وإيجاد وسائل بديلة آمنة صحياً وبيئياً، ومن هنا تأتي أهمية بحثنا هذا التي تهدف إلى:

1- عزل النيماتودا من الجنس *Meloidogyne* من جذور نباتات بندورة مصابة بتعقد الجذور وتحديد النوع التابع لهذا الجنس وتحضير لقاح نقي منه.

2- عزل الفطر *Trichoderma* من التربة المحلية ومن النيماتودا المعزولة من العقد الجذرية وتحديد الأنواع التابعة لهذا الجنس.

3- دراسة تأثير العزلات المحلية للفطر *Trichoderma* ضد أطوار مختلفة من نيماتودا تعقد الجذور في الظروف المخبرية ومقارنتها مع تأثير المستحضر التجاري Biocont ومع شاهد غير معدى بالفطر. وذلك وفق مايلي:

3-1- تأثير الفطر في كتل البيض.

3-2- تأثير الفطر في البيوض داخل كتل البيض.

3-3- تأثير الفطر في فقس البيوض من كتل البيض (أعداد J_2 الفاقسة من البيوض)

3-4- تأثير الفطر في البيوض المحررة من كتل البيض.

3-5- تأثير الفطر في إناث النيماتودا البالغة.

طرائق البحث ومواده:

تم إجراء البحث في مخابر قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – ومخابر قسم وقاية النبات – كلية الزراعة بجامعة تشرين في الفترة الواقعة بين 2009- 2010

1- جمع العينات: تم جمع 50 عينة عشوائية من ترب وجذور نباتات بندورة مصابة بنيماتودا تعقد الجذور من 25 بيتاً بلاستيكياً مزروعاً بالبندورة على طول الساحل السوري، وتم إحضارها إلى المختبر في صيف 2009 وذلك من 4 مناطق مختلفة من الساحل السوري موزعة كما في الجدول (1).

2- عزل نيماتودا تعقد الجذور وتحضير اللقاح النقي: تم عزل 10 إناث من النيماتودا المستقرة في العقد الجذرية المأخوذة من جذر بندورة مصاب من قرية الحويز في جبلة وتم تحديد النوع بوساطة التشريح المباشر باتباع النمط العجاني (تحورات الكيوتيكل العرضية للنهاية الخلفية لجسم الأنثى) بالاعتماد على مفاتيح التشخيص المعروفة (Barker *et al.*,1985)، وبهدف الحصول على كمية لقاح كافية ونقية من بيوض نيماتودا تعقد الجذور اللازمة لتنفيذ التجارب اللاحقة تم زراعة نباتات البندورة صنف صيف في تربة معقمة ببروميد الميثايل بمعدل استخدام 453غ/10م^3 تحت ظروف البيت البلاستيكي في كلية الزراعة – جامعة تشرين وإعدائها صناعياً ببيوض النوع الذي تم تعريفه من النيماتودا التابعة للجنس *Meloidogyne* والمشار إليها أعلاه.

3- عزل فطريات الـ *Trichoderma* من العينات:

تم عزل أنواع الفطر *Trichoderma* من عينات الترب المختلفة ومن إناث وكتل بيض النيماتودا المأخوذة من العقد الجذرية من جذور العينات الجذرية للجذور المصابة.

3-1- عزل فطريات الـ *Trichoderma* من النيماتودا:

3-1-1- عزل الفطريات الموجودة خارجياً على سطح النيماتودا: تم أخذ 5 إناث و5 كتل بيض نيماتودا من كل جذر، ثم نقلها بشكل منفصل (إناث وكتل بيض) إلى أطباق بتري (cm9) تحوي مستنبت PDA (Potato Dextrose Agar) مضافاً له مضاد حيوي أمبيسيلين، وتم التحضين عند حرارة 25 ± 2 م° لمدة 7 أيام. (Meyer *et al.*, 1990 ;Byrd *et al.*, 1979).

3-1-2- عزل الفطر المتطفل داخلياً على النيماتودا: تم أخذ 5 إناث و5 كتل بيض نيماتودا من كل جذر ثم عُقمت سطحياً باستخدام محلول كحولي مخفف (70%) لمدة 2-3 دقائق، وتم غسلها بالماء المقطر المعقم، ونقلها إلى أطباق بتري تحوي مستنبت PDA، وتحضينها عند حرارة 25 ± 2 م° لمدة 7 أيام (Freire and Bridge, 1985).

3-2- عزل فطريات الـ *Trichoderma* من التربة: تم عزل الفطر من التربة باتباع طريقة التخفيف لمحاليل التربة وذلك بوزن 1غ تربة جافة وناعمة من كل عينة ووضعت في أنبوب يحوي 9 مل ماء مقطر ومعقم ورج الأنبوب بشكل جيد للحصول على التركيز الأول (10/1)، ومنه نحصل على التراكيز الأخرى وصولاً إلى التركيز (1000/1) وبعدها تم أخذ 0.2 مل من كل تركيز ونشرها على سطح الطبق البتري الحاوي على مستنبت PDA ثم حُضنت الأطباق عند حرارة 25 ± 2 م° لمدة 7 أيام. (Monoson *et al.*, 1975)

4- تنقية الفطر *Trichoderma* : تم عزل مستعمرات *Trichoderma* من الأطباق السابقة وتنقيتها على مستنبت PDA، وعُرِّفت الأنواع بالاعتماد على الصفات المورفولوجية والمجهرية للمستعمرات والحوامل والأبواغ (شكل الحوامل والفياليدات والأبواغ الكونيدية والكلاميدية وقياساتها) وذلك باتباع طريقة الزراعة على شريحة زجاجية معقمة وتحضينها لمدة 4-6 أيام في درجة حرارة 25 ± 2 م° للحصول على مستعمرات نقية تفيد في تصنيف الفطر بسهولة (Rabbani, 2004 ;Rifai, 1964).

5- عزل الفطر *Trichoderma harzianum* من المستحضر التجاري Biocont: تم زراعة مسحوق المستحضر على وسط PDA في أطباق بتري بهدف الحصول على مستعمرة فطرية نقية من مادته الفعالة والتي هي أبواغ حية من الفطر *Trichoderma harzianum* ، على شكل مسحوق بمعدل 19×10^7 بوغة/غ محمولة على مواد عضوية طبيعية، يُستخدم في الإدارة المتكاملة للآفات (IPM) لكثير من المحاصيل الحقلية والفواكه والخضار حيث يؤمن لها الحماية الطبيعية ضد النيماتودا وفطور التربة الممرضة.

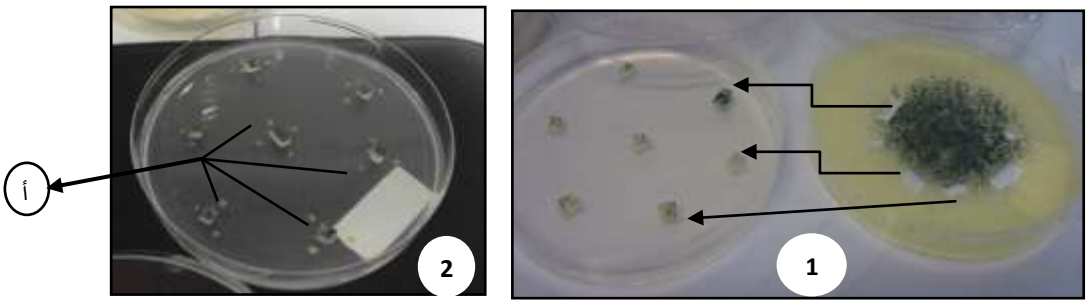
6- طرائق تقييم فاعلية العزلات المحلية للفطر *Trichoderma* ضد نيماتودا تعقد الجذور في الظروف المخبرية:

6-1- تقييم تأثير الفطر *Trichoderma* في كتل البيض:

تم عزل كتل بيض النيماتودا المعرفة حتى مستوى النوع من جذور نباتات البندورة المعداة التي تم تربيتها في البيت البلاستيكي، وغسلها بالماء المقطر المعقم بوساطة مناخل (قياس فتحاته 20 ميكرون)، وتعقيمها سطحياً بمحلول كحولي مخفف (70%) لمدة 2 دقيقة ثم غسلها مرة أخرى بالماء المقطر المعقم، ونقلها إلى أطباق بتري تحوي مستنبت الآغار (1%)، المكون من 10غ آغار في ليتر ماء مقطر معقم، معداة بشكل مسبق بـ 6 أقراص بقطر 3 مم مأخوذة من طرف مستعمرة الفطر المنماة على مستنبت PDA عمرها 7 أيام (لضمان تشكل الأبواغ) تعود للعزلات المحلية، ثم تم وضع هذه الكتل على بعد (2) مم من تلك أقراص، كما في الشكل(1)، وذلك باستخدام 4 كتل بيض لكل قرص وستة أقراص لكل عزلة وتحضينها عند حرارة 25 ± 2 م° لمدة 15 يوماً، وتم بعدها تسجيل نسبة تطفل الفطر على كتل البيض (Al-Qasim *et al.*, 2009).

6-2- تقييم تأثير الفطر *Trichoderma* في بيوض نيماتودا تعقد الجذور داخل كتل البيض:

تم نزع كتل البيض من الأطباق السابقة واستخلاص البيوض منها (باستخدام هيبوكلوريد الصوديوم تركيز 0.5% لمدة 3 دقائق) وتشكيل معلق من البيوض في 10 مل من الماء المقطر المعقم (Goodey *et al.*, 1963)، وإضافة 2-3 قطرات من محلول أزرق القطن Lactophenol للتفريق بين البيوض السليمة والمصابة (المُتطفل عليها من قبل الفطر)، من ثم تم فحص نصف ملليتر من المعلق تحت مجهر ضوئي بتكبير 100× وتسجيل النسبة المئوية للبيوض المصابة الملونة إلى السليمة الشفافة. وبهدف التأكد من أن التأثير يعود للفطر تم إضافة نصف ملليتر من معلق البيوض إلى أطباق بتري تحوي مستنبت PDA وتحضينها في حرارة 25 ± 2 م° لإعادة عزل الفطر الذي سبب هذا التطفل. (Khattak, 2008)



الشكل(1) طريقة تطبيق النيماتودا على الفطر
1- عزلة فطرية على مستنبت PDA بعمر 7 أيام (الطبق اليميني)
مستنبت آغار يحوي أقراص بقطر 2 مم من عزلة الفطر على مستنبت PDA (الطبق اليساري)
2- مستنبت الآغار الحاوي على أقراص الفطر وحول كل قرص 4 كتل بيض (أ)

6-3- تقييم تأثير الفطر *Trichoderma* في فقس البيوض من كتل البيض:

بعد نزع كتل البيض من أطباق الآغار السابقة، تم تسجيل أعداد اليرقات الناتجة عن فقس البيض من كتل البيض مباشرةً باستخدام الساترة وأزرق القطن، لمعرفة معدلات الفقس في المعاملات المختلفة تحت ظروف المختبر.

(Freire and Bridge, 1985)

6-4- تقييم تأثير الفطر *Trichoderma* في البيوض المحررة من كتل البيض:

تم الحصول على البيوض المحررة من 20 كتلة بيض نيماتودا معروفة النوع باستخدام هيبوكلوريد الصوديوم (0.5%) لمدة 3 دقائق وعُقمت البيوض سطحياً بمحلول كحولي مخفف (70%) لمدة دقيقتين (لضمان عدم وجود أي تلوث)، وتشكيل معلق من البيوض في 25 مل من الماء المقطر المعقم(Barker *et al.*, 1985; Goodey, 1963)، وبعدها تم نقل نصف ملليتر من هذا المعلق إلى أطباق بتري (9 سم) تحوي مستنبت آغار المعدى بـ 6 أقراص من الفطر كما سبق ذكره، وتحضينها عند حرارة 25 ± 2 م° لمدة 15 يوماً، وبعدها تم فحص 100 بيضة تحت المجهر مباشرةً بتكبير 100× وباستخدام محلول أزرق القطن وتسجيل نسبة البيوض المُتطفل عليها من قبل الفطر إلى البيوض السليمة (Al-Qasim *et al.*, 2009).

6-5- تقييم تأثير الفطر *Trichoderma* في الإناث البالغة لنيماتودا (RKN):

تم الحصول على إناث النيماتودا من جذور نباتات البندورة المعداة بنيماتودا تعقد الجذور والتي تم تربيتها في البيت البلاستيكي، وعُقمت سطحياً باستخدام الكحول (70%) لمدة 2-3 دقائق، غُسلت عدة مرات بالماء المقطر المعقم (Barker *et al.*,1985)، وبعدها نُقلت إلى أطباق بتري (9 سم) تحوي مستنبت آغار المعدى بـ 6 أقراص من الفطر، وذلك بنقل (4) إناث لكل قرص وستة أقراص لكل عزلة، وحُضنت عند حرارة 25 ± 2 م° لمدة 10 أيام، وبعدها سُجلت النسبة المئوية للإناث المصابة إلى السليمة مباشرةً تحت المكبرة (Freire and Bridge, 1985).

6-6- معاملات المستحضر التجاري: كانت معاملات المستحضر التجاري في كل التجارب السابقة باستخدام أطباق آغار تم إعدائها بأقراص من مستنبت PDA معدى بالفطر *T. harzianum* من عزلة المستحضر التجاري.

6-7- معاملات الشاهد: كانت معاملات الشاهد في كل التجارب السابقة باستخدام أطباق آغار تم إعدائها بأقراص من مستنبت PDA غير معدى بالفطر *Trichoderma*.

7- **التحليل الإحصائي ومعايير الدراسة:** تم حساب بالاعتماد على (Norton, 1978)

- التكرار المطلق لوجود الفطر *Trichoderma*: $\frac{\text{عدد العينات الحاوية للفطر}}{\text{عدد العينات الكلية}} \times 100$
- تأثير الفطر *Trichoderma* في كتل بيض النيماتودا: $\frac{\text{عدد كتل البيض المصابة}}{\text{عدد كتل البيض الكلية}} \times 100$
- تأثير الفطر *Trichoderma* في البيض داخل كتل بيض النيماتودا: $\frac{\text{عدد البيض المصاب}}{\text{عدد البيض الكلي}} \times 100$
- تأثير الفطر *Trichoderma* في البيض المحرر من كتل بيض النيماتودا: $\frac{\text{عدد البيض المصاب}}{\text{عدد البيض الكلي}} \times 100$
- تأثير الفطر *Trichoderma* في إناث النيماتودا: $\frac{\text{عدد الإناث المصابة}}{\text{عدد الإناث الكلية}} \times 100$

- تمت معالجة النتائج باستخدام برنامج SPSS وحساب الفروق المعنوية بين المعاملات عند المستوى 5% ومعامل التباين (الاختلاف) بينها.
- تم حساب متوسط النسب المئوية لتطفل العزلات الفطرية التي لم يوجد بينها فروق معنوية.

النتائج والمناقشة:

1- تحديد نوع النيماتودا من جنس *Meloidogyne*: بينت نتائج تحديد نوع النيماتودا أنها تتبع للنوع *M. incognita* Goeldi الشكل (2) وهذه النتيجة تتفق مع ما جاء في دراسات انتشار أنواع الجنس *Meloidogyne* التي حددها البلخي وجمعة (1989) ومعروف وزملاؤه (2005).

2- عزل الفطر *Trichoderma* وتحديد الأنواع: بينت نتائج عزل الفطر *Trichoderma* من عينات الترب ومن عينات إناث وكتل بيض النيماتودا المأخوذة من العقد الجذرية من الجذور المصابة على أن 14 عينة من أصل 50 تحتوي على الفطر *Trichoderma* بتكرار مطلق بلغ 28% من العينات الكلية كما في الجدول (1)، وبالتنقية حصلنا على 7 عزلات محلية مختلفة من الفطر *Trichoderma*، تابعة لثلاثة أنواع مختلفة هي:

T. viride Pers. ex s.f. Gray ، *T. harzianum* Rifai ، *T. longibrachiatum* Rifai ويبين الجدول (2) أنواع الفطر *Trichoderma* المعزولة من مناطق الدراسة وأبعاد هذه العزلات مقارنةً مع قياسات الأبعاد العالمية (Rifai, 1964)، وقد تميزت أغلب العزلات بمستعمرات ذات لون أخضر مزرق وحواف بيضاء، قطنية، مع ظهور حلقات متحدة المركز على مستنبت PDA، وعند اتباع طريقة الزراعة على شريحة زجاجية تبين أن الحوامل الكونيدية لها تفرع شجيري تنتهي بفياليدات تختلف بالشكل والحجم، تتوضع عليها أبواغ كونيدية دائرية إلى متطاولة الشكل خضراء داكنة أو فاتحة اللون ملساء أو خشنة الجدار حسب النوع الشكل(3)، وقد بين Rifai (1964) جميع هذه الصفات لأنواع الجنس *Trichoderma*. وتُعد هذه الدراسة الأولى من نوعها في سورية من حيث عزل الفطر *Trichoderma* من أطوار مختلفة من النيماتودا، مع الإشارة إلى دراسة (Al-Qasim *et al.,* 2009) التي تبين فيها عزل الفطر *Paecilomyses* من النيماتودا.

3- نتائج تقييم فاعلية العزلات المحلية للفطر *Trichoderma* على نيماتودا تعقد الجذور *M. incognita* مخبرياً:

3-1- تأثير الفطر *Trichoderma* في كتل البيض النيماتودا (% كتل مصابة):

أظهرت النتائج قدرة تطفل عالية لعزلات الفطر المحلية على كتل بيض النيماتودا، حيث بلغ أعلى نسبة تطفل للعزلة المحلية رقم 7 *T. harzianum* على كتل بيض نيماتودا *M. incognita* (95%) مقارنةً مع المستحضر التجاري (39,98%) كما في الجدول(3) والشكل (4)، وهذا يتفق مع دراسة Goswami وزملائه (2006) الذي يؤكد الدور الهام للعزلات المحلية، التي قام بدراستها، في التطفل على كتل بيض النيماتودا مسببةً انخفاض في حيوية البيوض بداخلها ومن ثم تخفيض خروج يرقات حية لتصيب جذور سليمة.

3-2- تأثير الفطر *Trichoderma* في البيوض داخل كتل بيض النيماتودا (% بيوض مصابة):

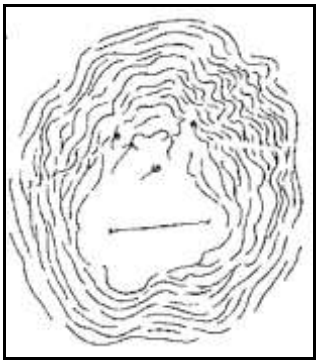
تم إجراء هذه التجربة من أجل تأكيد دخول الفطر إلى داخل كتل بيض النيماتودا، وقد بينت النتائج أن جميع العزلات المحلية للفطر لها كفاءة عالية في التطفل على البيوض داخل كتل بيض نيماتودا (RKN) *M. incognita* وبفروقات معنوية فيما بينها وبين المستحضر التجاري ، ويبين الجدول (3) أن العزلة المحلية السابعة كانت الأقوى وبلغت نسبة تطفلها (43,70%) بينما بلغ متوسط تطفل العزلات المحلية الأخرى والتي لا توجد بينها فروق معنوية (35,07%)، وهي نسب أعلى من نسبة تطفل المستحضر التجاري والتي بلغت (26,20%).

3-3- تأثير الفطر على فقس البيض من كتل بيض النيماتودا (متوسط عدد اليرقات J_2 الفاقسة): أظهرت النتائج في الجدول(3) انخفاضاً في عدد اليرقات الفاقسة من كتل البيض وبفارق معنوي كبير بين جميع العزلات

المحلية وبين المستحضر التجاري والشاهد، حيث بلغ متوسط فقس البيض عند تطبيق جميع العزلات المحلية والتي لا يوجد فروق معنوية فيما بينها (15,96%) مقارنةً مع المستحضر التجاري والشاهد والذي بلغ (41,50%)،(51%) على التوالي، ويبين الشكل (5) تطفل الفطر *Trichoderma* بالتفاف خيوطه الفطرية على يرقات J_2 الفاقسة من كتل البيض في جميع العزلات المحلية ولاسيما العزلات 3 و4 و7 ودخول هيفات الفطر إلى داخل اليرقات، مقارنةً بوجود يرقات متحركة وشفافة في الطبق الشاهد وهذا يتفق مع دراسة Windham (1993) ودراسة Zareen وزملائه (2001) و Khan وزملائه (2002) و Abd Al-Fattah وزملائه (2007) من حيث آلية التطفل المباشر للفطر على النيماتودا نتيجة إفرازه لأنزيمات مختلفة مثل chitinas, glucanase, protease التي تحلل كيتين كيوتيكل اليرقة ودخول هيفات الفطر ليتغذى ويتكاثر داخلها، كما لوحظ في الشكل (6) حلقات يشكلها الفطر *Trichoderma* على مستنبت الآغار الفقير كآلة افتراس وقنص، وتم التأكد من أن هذه الحلقات خاصة بالفطر المدروس عن طريق الحوامل والأبواغ المتشكلة على خيوط هذه المستعمرة، وهذا يتفق مع دراسة Aboul-Eid وزملائه (1997) ودراسة Ali وزملائه (1994) الذين قاموا بعزل العديد من فطريات التربة المفترسة للنيماتودا مثل أجناس : *Trichoderma, Arthrobotrys, Dactylella, Verticillium* (بغدادي، 2002) .

3-4- تأثير الفطر في البيوض المحررة من كتل بيض النيماتودا (% بيوض مصابة):

أظهرت النتائج قدرة عالية لتطفل جميع العزلات المحلية المدروسة للفطر على البيوض المحررة حيث ارتفعت النسبة المئوية للبيوض المصابة (الملونة والمُتطفل عليها) إلى السليمة (البنية) وكانت العزلات الأقوى 3 و4 و7 والتي لم يُلاحظ فروق معنوية فيما بينها وبلغ متوسط النسبة المئوية لتطفل تلك العزلات (71,41%)، بينما بلغ متوسط تطفل العزلات المحلية المتبقية والتي لم يُلاحظ فروق معنوية فيما بينها أيضاً (55,88%)، مقارنةً مع نسبة تطفل المستحضر التجاري (40,20%) كما هو موضح في الجدول (3) حيث ازدادت نسب تطفلها عن معدلات التطفل على البيوض داخل كتل البيض وهذا يدل على وجود دور للغلاف الجيلاتيني المحيط بالبيض في التقليل والحد من دخول النموات الفطرية إلى داخل البيض وذلك بالنسبة لجميع العزلات، ويتفق ذلك مع دراسة Siddiqui وزملائه (2001) في الباكستان حيث سبب الفطر نسبة تطفل عالية للبيوض على أوساط صنعية وصلت إلى 53%. ويوضح الشكل (7) التفاف ودخول خيوط الفطر إلى داخل البيض المحرر مُسبباً انخفاض في عدد اليرقات الفاقسة، وقد يكون ذلك بسبب الأنزيمات التي يفرزها هذا الفطر ولاسيما أنزيم الكيتيناز الذي يحلل قشرة البيوض مما يُسهل دخول الخيوط والتغذي على محتويات هذه البيوض (Windham, 1993).



صورة مرجعية (Perry *et al.*, 2009)

صورة أثناء تنفيذ العمل

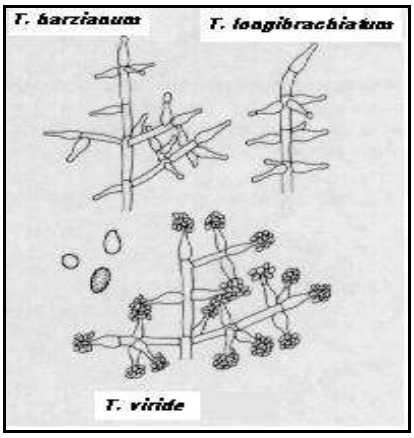
شكل(2) المقطع العجاني لإناث نيماتودا (RKN) والتابعة للنوع *M. incognita*

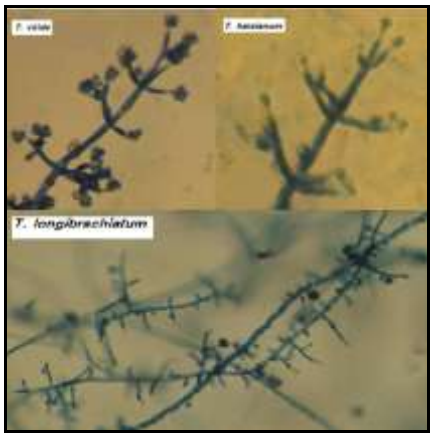
الجدول(1): توزع عينات التربة والجذور المصابة بنيماتودا تعقد الجذور وتكرار عزلات الفطر *Trichoderma* في العينات في مواقع الدراسة

المنطقة	اسم القرية	عدد العينات الترابية	عدد العينات الجذرية	عينات التربة الحاوية على الفطر	عينات الجذور المصابة بالنيماتودا والحاوية على الفطر	عدد العينات الحاوية على الفطر	عدد العينات الكلية
جبلة	الشراشير	8	8	★	—	5	16
	القلايع			—	—		
	الحويز			★	—		
	بساتين صالح			★	—		
	سيانو			—	—		
	القطلبية			—	—		
	العيدية			★	—		
	بسيسن			★	—		
بانياس	عرب الملك	7	7	—	—	3	14
	القلوع			—	★		
	قرفيص			★	—		
	حريصون			★	—		
	الدروك			—	—		
	دير بشر			—	—		
	السن			—	—		
اللاذقية	الهنادي	5	5	—	★	4	10
	البصة			★	—		
	الصنوبر			★	—		
	القنجرة			—	—		
	قمين			★	—		
طرطوس	الروضة	5	5	—	—	2	10
	الخراب			★	—		
	الحصين			★	—		
	الديرون			—	—		
	الحميدية			—	—		
المجموع		25	25			14	50

(★) وجود الفطر ، (—) عدم وجود الفطر

التكرار المطلق = (50/14)× 100 = 28%





صورة مرجعية (http://google/wikipedia.org) صور أثناء تنفيذ العمل

الشكل (3): الحوامل الكونيدية لبعض أنواع الفطر *Trichoderma* وتوضع الفياليدات والأبواغ الكونيدية عليها (400×)

الجدول (2) يبين أنواع الفطر *Trichoderma* المعزولة من مناطق الدراسة وأبعاد هذه العزلات (تكبير 40×)

رقم العزلة	المنطقة/نوع العينة	نوع العزلة	قطر المحور الرئيسي لحامل الأبواغ µm	قطر الفروع الجانبية لحامل الأبواغ µm	أبعاد الزوائد القارورية (الفياليدات) µm	قطر البوغة الكونيدية µm	قطر البوغة الكلاميدية µm
1	جبلة / تربة	*Trichoderma viride*	3.6	1.2	2.5×8	3.6	10.2
2	طرطوس / تربة	*T. viride*	2.4	2.4	2.5×9.5	4.5	9.6
3	اللاذقية / إناث غير معقمة	*T. longibrachiatum*	3.2	-	2.7×9	3.5	10.7
4	بانياس / كتل بيض معقمة	*T. longibrachiatum*	2.5	-	2.7×8	2.5	11.2
5	بانياس / تربة	*T. viride*	1.68	1.2	2.5×8.5	4.5	9.6
6	اللاذقية / تربة	*T. viride*	1.76	1.2	2.5×9	4	9.6
7	جبلة / تربة	*T. harzianum*	2.16	1.2	3×4.5	2.5	6.3

3-5- تأثير الفطر على إناث النيماتودا (% إناث مصابة):

أظهرت النتائج كفاءة عالية لتطفل جميع عزلات الفطر المحلية على إناث نيماتودا تعقد الجذور وبفروق معنوية واضحة بينها، حيث بلغ أعلى معدل تطفل للفطر في العزلة المحلية (7) *T. harzianum* (90,56%) مقارنةً مع معدل تطفل المستحضر التجاري (63,22%) الجدول (3) ويظهر الشكل (8) تطفل الفطر على الأنثى غير المتحركة التي تعيش لمدة تزيد عن أسبوعين بدون تغذية (Perry *et al.*, 2009) مسبباً منعها من تشكيل كتلة البيض وإعطاء طور يرقي مُعدي جديد .

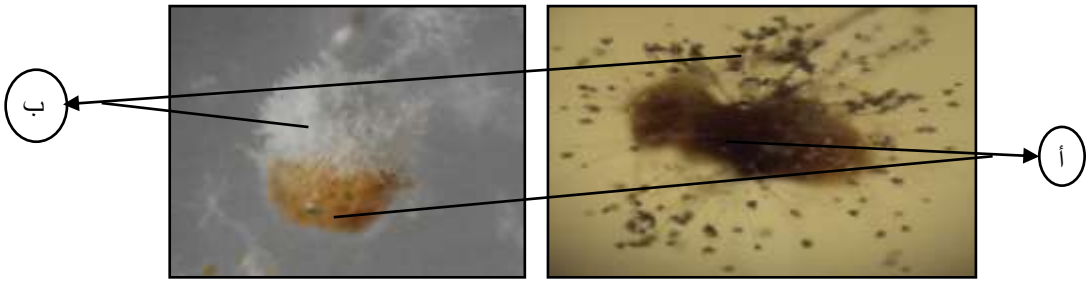
نتائج تأكيد التأثيرات المختلفة للفطر على أطوار النيماتودا: أثبتت نتائج إعادة عزل الفطر المتطفل على بيض وإناث نيماتودا تعقد الجذور من أطباق الآغار وزراعتها بأطباق تحوي مستنبت PDA أنه يتبع فعلاً للجنس

Trichoderma وذلك للتأكد من أن الفطر المتطفل على أطوار النيماتودا المختلفة الذي سبب التأثيرات السابقة هو الفطر المدروس من جنس *Trichoderma* .

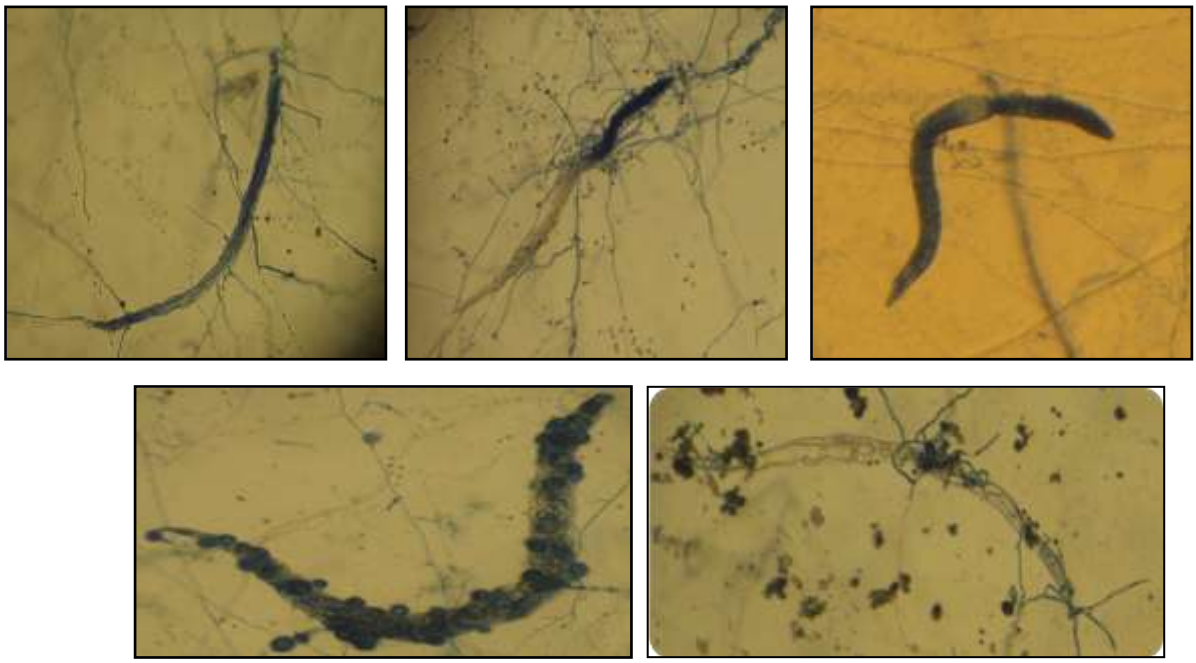
الجدول (3): الأنواع المسجلة من الفطر التابع للجنس *Trichoderma* في مواقع الدراسة ونتائج التأثيرات المختلفة لتلك العزلات على أطوار نيماتودا تعقد الجذور *M. incognita* مقارنةً بالشاهد والمستحضر التجاري

رقم العزلة	المنطقة/نوع العينة	نوع العزلة الفطرية	تأثير الفطر على كتل البيض (% كتل مصابة)	تأثير الفطر على البيض داخل كتل البيض (% بيوض مصابة)	تأثير الفطر على البيض المحرر من كتل البيض (% بيوض مصابة)	تأثير الفطر على فقس البيض (متوسط عدد J_2)	تأثير الفطر على الإناث (% إناث مصابة)
1	جبلة/تربة	*Trichoderma viride*	ab 86.64	ab 37.36	b 60.43	cd 10.75	b 83.16
2	طرطوس/ تربة	*T. viride*	bc 68.32	bc 34.04	cd 55.33	b 21.75	c 71.22
3	اللاذقية/إناث غير معقمة	*T. longibrachiatum*	cd 59.96	ab 37.86	a 71.47	bcd 14.50	d 66.30
4	بانياس/ كتل بيض معقمة	*T. longibrachiatum*	bc 68.30	ab 37.64	a 71.50	bc 17.75	f 58.06
5	بانياس/ تربة	*T. viride*	d 38.32	bc 30.54	d 51.18	bc17.50	e 63.22
6	اللاذقية/تربة	*T. viride*	bc 73.32	bc 33.00	bc 56.58	b23.75	b 82.02
7	جبلة/ تربة	*T. harzianum*	a 95.00	a 43.70	a 71.25	d 5.75	a 90.56
المستحضر التجاري Biocont		*T. harzianum*	d 39.98	c 26.20	e 40.20	a 41.50	e 63.22
الشاهد			0	0	0	a 51	0
Error mean square			257.831	44.317	8.505	45.509	4.343
cov %			%27.28	%21.37	%5.49	%29.73	%3.25

المعدلات المتبوعة بالأحرف ذاتها عمودياً لا تختلف معنوياً اعتماداً على اختبار دانكان بمستوى ثقة 95%.

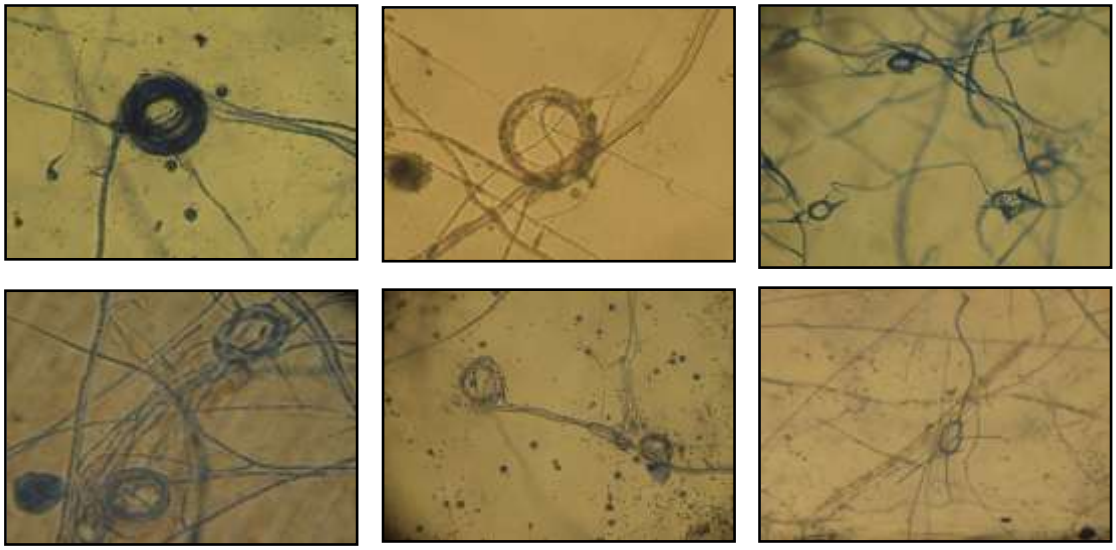


شكل (4): تطفل العزلة المحلية للفطر *T. harzianum* على كتل بيض النيماتودا *M. incognita* في أطباق الآغار (45×)
أ- كتل بيض مصابة بالفطر ، ب- نموات فطرية للفطر *T. harzianum* (صور أثناء تنفيذ العمل)

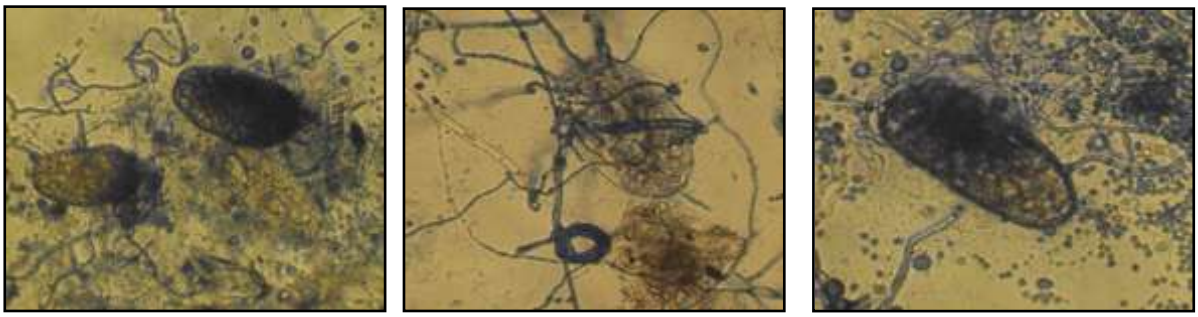


شكل (5): تطفل الفطر *T. harzianum* على اليرقات الفاقسة من بيوض نيماتودا *M. incognita* في أطباق الآغار (100×)
صور أثناء تنفيذ العمل

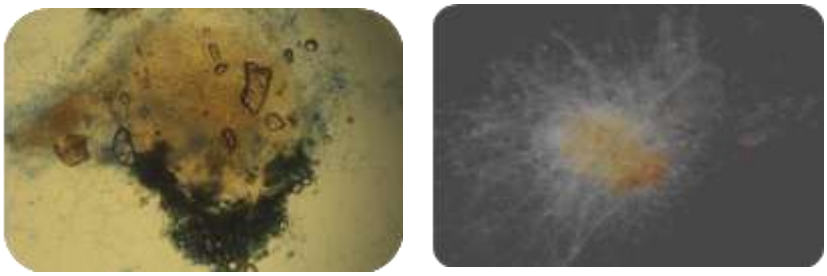
شكل



(6): يبين الحلقات التي يشكلها الفطر *T. harzianum* كوسيلة لصيد نيماتودا *M. incognita* في أطباق الآغار (200×)
صور أثناء تنفيذ العمل



شكل (7): تطفل الفطر *T. harzianum* على بيض النيماتودا *M. incognita* المحرر من كتل البيوض في أطباق الآغار(200×) صور أثناء تنفيذ العمل



شكل (8): تطفل الفطر *T. harzianum* على إناث نيماتودا *M. incognita* في أطباق الآغار (45×)،(200×) صور أثناء تنفيذ العمل

الاستنتاجات والتوصيات:

نستنتج من هذا البحث:

1- تم عزل الفطر *Trichoderma* من إناث وكتل بيض النيماتودا الموجودة في الجذور المصابة بنيماتودا تعقد الجذور.

2- تملك العزلات المحلية السبعة من الفطر *Trichoderma* والتي تتبع للأنواع: *T. viride* ، *T. harzianum*، *T. longibrachiatum* قدرة عالية على التطفل المباشر على بيوض النيماتودا الموجودة ضمن كتل البيض داخل الكيس الجيلاتيني وكانت قدرتها على التطفل أكبر على البيوض المحررة من الكتل.

3- إن مهاجمة الفطر *Trichoderma* لبيوض النيماتودا *M. incognita* أدى إلى انخفاض نسبة فقس البيوض وهذا له أهمية في تقليل ظهور الطور المعدي من النيماتودا.

4- أثبتت العزلات المحلية للفطر قدرتها العالية في التطفل المباشر على يرقات الطور المعدي J_2 للآفة وذلك من خلال تشكيل حلقات افتراس يحيط باليرقة ويتغذى عليها.

5- إن كفاءة العزلة المحلية الأقوى *T. harzianum* في جميع التجارب (على كتل البيض والبيض داخل الكتل والبيض المحرر من كتل البيض وعلى فقس البيض وعلى إناث النيماتودا) أكبر من كفاءة العزلة التجارية من الفطر ذاته.

6- تم الحصول على عزلتين فطريتين من نيماتودا تعقد الجذور تابعتين لنفس النوع وهو: *T. longibrachiatum* .

ونوصي بما يلي:

1- إجراء الاختبارات الحقلية تحت ظروف البيئة المحلية من أجل تقييم أدق وأعمق لدور هذه العزلات المحلية للفطر في السيطرة ولو جزئياً على تلك الآفة حقلياً.

2- إجراء التجارب المخبرية لكشف الأنزيمات التي ينتجها هذا الفطر والتي تساعده في التطفل على النيماتودا.

المراجع:

1. أبو عرقوب، محمود، *المقاومة الحيوية لأمراض النبات*. الطبعة الأولى، مطبوعات جامعة قاريونس، ليبيا، 2000 ، 684.
2. أبوغربية، وليد؛ زهير اسطيفان؛ أحمد الحازمي؛ أحمد دوابة. *نيماتودا النبات في البلدان العربية*. الطبعة الأولى، إصدار الجمعية العربية لوقاية النبات، لبنان، 2010، 1242.
3. البلخي، منهل ومحمد جمعة. *دراسة حصر نيماتودا تعقد الجذور على العائلة الباذنجانية والقرعية في سوريا*، منشورات أسبوع العلم 29، جامعة حلب، سورية، 1989، ص 13.
4. الحازمي، أحمد سعد؛ زهير اسطيفان؛ لما شريف البنا؛ أمين وفدي أمين. *المكافحة الأحيائية لنيماتودا النبات*. الطبعة الأولى، دار وائل للنشر، الأردن، 2010، 973-1015.
5. بغدادي، وفاء. *دراسة بيئية وتصنيفية لانتشار أنواع من الفطريات المفترسة والمتطفلة على الديدان (المؤنية والحرة) في منطقة دمشق*، مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية، 2002 ، المجلد 18 العدد 2 .
6. بوراس، متيادي؛ أبوترابي، بسام؛ البسيط، ابراهيم، *إنتاج محاصيل الخضر*. الطبعة الأولى، مطبوعات جامعة دمشق، سورية، 2005 ، 466.
7. لامبرتي، فرانكو. *مشاكل النيماتودا في زراعة الخضار والحمضيات في سوريا*. تقرير أُعد لأجل الجمهورية العربية السورية من قبل المنظمة الأغذية والزراعة التابعة للأمم المتحدة بوصفها هيئة تنفيذية لبرنامج الأمم المتحدة للإنماء، 1983.
8. معروف، فراس؛ ندى ألوف ؛ صباح المغربي. *تأثير وتطور أعداد نيماتودا تعقد الجذور Meloidogyne sp. على نبات الباذنجان*. دراسة أُعدت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية كلية الزراعة، جامعة تشرين، سورية، 2007، 87.
9. ALI, A. H. H. and M. L. E. BARAKAT (1994). *Utilization of Trichoderma harzianum as a biological agent against root-knot nematode Meloidogyne incognita*. Egypt J. Biol. Pest Control. 4 (1): 67-77.
10. ABD AL-FATTAH A. DABABAT and RICHARD A. SIKORA. *Use Trichoderma harzianum and Trichoderma viride for the Biological control of Meloidogyne incognita on tomato.* Jordan Journal of Agriculture Sciences. Germany,3(3), 2007, 297-309.
11. ABOUL-EID, H.Z., N.A. ABDUL-BARI, A.M. KORAYEM, and E.A. NOWEER. *Concomitant occurance of nematode-antagonistic fungi and bacteria associated with prevalent nematodes in Mansouria region soils.* Egypt, 1997, J. Agronematol.,1:37-58.

12. AL-QASIM,M.; W. ABO-GHARBIEH; K.ASSAS. *Nematophagal ability of Jordan Isolates of Paecilomyces variotii on the Root-Knote Nematode Meloidogyne javanica*. Nematol medit. Jordan, 37, 2009, 53-57.
13. AGRIOS, G. *Plant Pathology*. 5th. Ed., Elsevier Academic press, University of Florida, USA, 2004, 948.
14. BARKER, K.; J. SASSER; C. CLAYTON. *An advanced treatise on Meloidogyne*. Methodology USA, 1985, 223.
15. BYRD, D.W.; K. R. BARKER; H. FERRIS; C. J. NUSBAUM; W. E. GRIFFIN; R. H. SMALL; C. A. STONE. *Two Semi-automatic Elutriators for Extracting Nematodes*

and Certain Fungi from Soil. journal of Nematology USA, 8(3), 1979, 206-212.
16. FREIRE, F.; BRIDGE, J. *Parasitism of eggs, females and Juveniles of Meloidogyne incognita by Paecilomyces Lilacinus and Verticillium Chlamydosporium*. Fitopatologia brasileira Brazil, 10(3), 1985, 577-596.
17. GOODEY, J. B. *Laboratory Methods for work with Plant and Soil Nematodes*. Technical Bulletin No.2 ,Nematology Department, London, 1963, 1-20.
18. GOSWAMI, B.K.; RAJESH KUMAR PANDEY; KABINDRA SINGH RATHOUR; CHAITALI BHATTACHARYA and LOKENDRA SINGH. *Integrated application of some compatible Biocontrol agents along with mustard oil seed Cake and furdan on Meloidogyne incognita infecting tomato plans*. Journal of Zhejiang university Science India, 7(11), 2006, 873 – 875.
19. KERRY, B.R.; R.H. BROWN. *Principles and practice of Nematode Control in crops*. 2nd. Ed., Academic Press Australia, 1987, 363.
20. KHAN HAFEEZ ULLAH; R. AHMAD; W. AHMED; S.M. KHAN; ASLAM KHAN. *Evalution of the combined Effects of Paecilomyces Lilacinus and Trichoderma harzianum Against Root _Knot Disease of tomato*. Current Nematology Pakistan, 3(1), 2002, 139–142.
21. KHATTAK, B. *Biological control of Meloidogyne Javanica (TREUB) chitwood with Trichoderma harzianum Rifai on tomato.* Scientific Khyber Pakistan, 15(1), 2002 85-94 .
22. KHATTAK, B. *Biological management of Root Knot Nematode Meloidogyne incognita with Trichoderma harzianum Rifai in tomato*. Adapted from a thesis submitted for the degree of doctor of Philosophy at the Faculty of crop protection sciences, NWEP Agriculture University Peshawar, Pakistan, 2008, 157
23. MANKAU, R. *Biocontrol Fungi as Nematode Control Agents*. journal of Nematology USA, 12(4), 1980, 244-252.
24. MEYER, S.; R. HUETTEL; R. SAYRE. *Isolation of Fungi from Heterodera glycines and in vitro Bioassays for Their Antagonism to Eggs.* Journal of Nematology USA, 22(4), 1990, 532-537.
25. MEYER, S.L.; DANIEL ROBERTS; DAVID CHITWOOD; L.K. CARTA; R.D. LUMSDEN; WEILI MAO. *Application of Burkholderia cepacia and Trichoderma virens Alone and in combination Against Meloidogyne incognita on Bell pepper.* Nematropica USA, 31(1), 2001, 75-86.
26. MONOSON, H.; T. D. CONWAY; R. E. NELSON. *Four Endoparasitic Nematode Destroying Fungi Isolated From Sand Ridge State Forest Soil*. Mycopathologia Illinois, 57 (1), 1975, 59-62.
27. NORTON, D. C. Ecology of Plant-Parasitic nematodes. John wiley and Sons, New York USA, 1978, 268.

28. OMAR, J.; P. JOHN WALLER; J. HÖGLUND; P. CHANDRAWATHANI; MICHAEL LARSEN; W. M. ZAHARI. *Nematophagous fungi as a biological control agent for nematode parasites of small ruminants in Malaysia: a special emphasis on Duddingtonia flagrans*. Biological control of sheep parasites in Malaysia, 33(1),2002,685-696.
29. PERRY, R.N.; M. MOENS; J. L. STARR. *Root-knot Nematodes*. Department of Plant Pathology and Microbiology, Texas University, , USA, 2009, 488
30. RABBANI, G.M. *Fungal Bonsai.* Mycologia, 55(1), 2004, 1-5.
31. RIFAI, M. A. *A Revision of the Genus Trichoderma*. Adapted from a thesis submitted for the degree of master of science at the Faculty of Pure science, University of Sheffield, England, 1964, 55.
32. SAHHEBANI, N.; N. HADAVI. *Biological control of the root - knot nematode Meloidogyne javanica by Trichoderma harzianum*. Science Direct Iran, 40 (8), 2008, 2016 – 2020.
33. SANTHOSH, E.; RAMANA, K. V.; BEENA, B. *Tropical soil micro flora of spice-based cropping system as potential antagonists of root Knot nematodes*. Science Direct– journal of invertebrate pathology India, 88 (3), 2005, 218-225.
34. SIDDIQUI, IMRAN A.; AMER–ZAREEN; M. JAVED ZAKI; S. SHAHID SHAUKAT. *Use of Trichoderma Species in the Control of Meloidogyne javanica Rot Knot Nematode in Okra and Mungbean.* Pakistan Journal of Biological Sciences Pakstan, 4(7), 2001, 846-848.
35. SINGH, R.; SITARANAIAH, K. *Plant pathogens the plant parasitic Nematodes.* Oxford and IBH publishing, India, 1994, 435.
36. STIRLING, G. R. *Biological control of plant parasitic Nematodes*. Redwood Press Ltd, UK, 1991, 282.
37. WINDHAM, G. L.; G. A. Pederson. *Interaction of Trichoderm harzianum, Meloidogyne incognita , and Meloidogyne arenaria on Trifoliun Repens*. Nematropica USA, 23(1), 1993, 99-103.
38. ZAREEN, A.; NARGIS JAMI KHAN; M. JAVED ZAKI. *Biological Control of Meloidogyne javanica (chitwood), Root Knot Nematodes of okra Abelmoschus esculentus.* Pakistan journal of Biological Sciences Pakistan, 4 (8), 2001, 990 – 994.