

دراسة تأثير بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وخميرة *Kluyveromyces marxianus* فينمو فطر *Rhizoctonia solani* مختبريا ودرجات الحرارة المختلفة وعمق التربة حقليا

ابتسام ثامر جعاز

جامعة القادسية / كلية التربية

E.Mail : Ebtesam thamer96@yahoo. com

تاريخ قبول النشر : 2016/3/24

تاريخ استلام البحث : 2015/11/18

الخلاصة

تم اجراء هذه الدراسة بهدف التعرف الى كفاءة خميرة *Kluyveromyces marxianus* وبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بصورة منفردة كلا على حدة ضد فطر *Rhizoctonia solani* المسبب لمرض تعفن الجذور الطري , اظهرت بكتريا *P.aeruginosa* فعالية عالية كعامل مكافحة احيائية ضد فطر *R.solani* على الوسط الزراعي PDA اذ بلغت نسبة التثبيط 100% بتركيز 10^8 خلية/مل اما خميرة *K.marxianus* فلقد تثبتت نمو الفطر بنسبة 88% في حين كانت 0.0% في معاملة المقارنة , ان كل من عالق وراشح بكتريا *P.aeruginosa* قد تثبط انبات ابواغ الفطر *R.solani* بالكامل اما النسبة المئوية لانبات الابواغ للخميرة *K.marxianus* فكانت للعالق 2.1% ومعدل اطوال الانابيب الجرثومية 8 مايكرومتر اما راشح الخميرة فكانت نسبة التثبيط 2.2% اما معدل اطوال الانابيب فقد وصل الى 9 مايكرومتر اذ كان لهما تفوق معنوي عند $P=0.05$ اما معاملة المقارنة فنسبة الانبات للابواغ وصلت الى 97% اما معدل اطوال الانابيب وصل الى 25 مايكرومتر , ولقد انتج فطر *R.solani* ثلاث انزيمات تساعد في الامراضية وهي cellulase وpectinase وprotease لكنه لم ينتج انزيم lipase , اما فيما يخص درجات الحرارة فالفطر لا ينمو في حرارة 10 م° لمدة 27 يوم كذلك حرارة (35 , 40 , 45) م° لمدة 14 يوم ولا ينمو ايضا في 50 م° لمدة 26 يوم وينمو في حرارة 12 م° لمدة 20 يوم لكن النمو الامثل له يكون في حرارة 20 م° لمدة 18 يوم وبحرارة 25 م° لمدة 17 يوم كذلك 30 م° لمدة 16 يوم , اما بالنسبة لتواجد الفطر في اعماق التربة فقد كان متواجدا في عمق (1 , 4 , 7 , 10 , 13) cm بينما لم يتواجد في عمق 16 cm.

Key Words : *Kluyvermyces marxianas* , *Pseudomonas aeruginosae* , *Rhizoctonia solani* .

المقدمة

الاقتصادية للمحاصيل المهمة في حياة الانسان (Velusamy and Kim, 2011). فتضمنت هذه المكافحة فعاليات جينية مضادة للفطريات الممرضة للنباتات (Bakthavate , 2013) , rizobateria . فنمو rizobateria يحسن صحة التربة ويعمل على حماية المحاصيل وبشكل حيوي , اذ تعمل على استحثاث المقاومة الجهازية لدى النبات ضد الممرضات والحشرات (Shafique et al , 2015). كما تلعب دورا مهما في تغيير البيئة التي يعيش فيها النبات ايجابيا وتحسين قدرة البكتريا على التداخل مع الممرض من خلال انتاج المغذيات المعدنية والمضادات والمواد الايضية الثانوية و الاحماض الامينية كذلك siderophors

ان استخدام المواد الكيماوية لغرض مقاومة الفطريات الممرضة للنبات يحمل بعض الآثار السلبية اذ تزايدت المقاومة من قبل الفطريات اما الزيادة في استخدامها سبب مشاكل في تلوث البيئة ومخاطر على صحة الانسان والحيوان (Shafique et al , 2015). ذكر Reddy (2014) et al ان هذه المواد تؤدي لتجمع مواد سامة في التربة مسببة عدم صلاحيتها للزراعة كما انها تختزل المواد العضوية وانتاج المواد المغذية , فتم الاستعانة بالسيطرة الحيوية Biocontrol لغرض حماية البيئة من هذه المخاطر (Mansor et al , 2007). فاعطت المكافحة الحيوية ادارة وسيطرة جيدة على الامراض الفطرية وبالتالي تقليل الخسائر

- على انتاجها للإنزيمات التي تشارك في هذه العملية .
3. استخدام طريقة مكافحة الحيوية biocontrol باستخدام بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*
4. و خميرة *Kluyvermyces marxianus* ضد هذا المرض لبيان قدرتها على تثبيط نموه .
5. دراسة تأثير درجات الحرارة على نمو هذا الفطر لمعرفة الحرارة الملائمة لذلك كذلك دراسة تواجد هذا الفطر في الاعماق المختلفة للتربة .

المواد وطرائق العمل

- 1- العزل والزرع
تم عزل فطر *R. solani* من جذور نبات الطماطة المصابة بعفن الجذور الطري soft root rot اذ تم غسل الجذور بالماء المقطر ثم بمحلول هايپوكلوريت الصوديوم 1% ولمدة دقيقة وتركت لتجف (Gilmar et al , 2007) , بعدها اخذت قطع من الجذور وزرعت على وسط (PDA) potato dextrose agar وحضنت بحرارة 25 م° لمدة 17 يوم ثم زرعت ثانويا عدة مرات للحصول على المزرعة الخام اما بالنسبة لخميرة *K. marxianus* وبكتريا *P. aeruginosa* فلقد عزلت من التربة المحيطة بنباتات الطماطة غير المصابة اذ اخذت من حقل غير مصاب وذلك بنثر 0.25 غم من التراب مأخوذ من عمق 10 C على اكار (PDA) potato dextrose agar وحضنت في حرارة 28 م° لمدة 7 ايام لعزل الخميرة وعلى وسط مكوني اكار MaCconky agar في حرارة 37 م° لمدة 2 يوم (Haggag and EL Gamal , 2012) .
- 2-التشخيص المظهري والمجهري : شخصت عزلات الخميرة *K. marxianus* والفطر *R. solani* وفقا لما جاء في (Mew and 2010 , Gonzales) , اما بكتريا *P. aeruginosa* فشخصت كما جاء في (Coolle et al , 1996) .
- 3-تثبيط النمو لفطر *R. solani* باستخدام بكتريا *P. aeruginosa* و خميرة *K. marxianus*

و hydrolytic enzymes و B1,3 glyconase و chitinase و Gibberlins المحفز لنمو النبات وتحسين دفاعات الجذور ضد الممرضات النباتية و اختزال انتاج ethylene (Sindhu et al , 2004) .

تؤثر الامراض الفطرية النباتية على انتاج الاغذية الزراعية بشكل واسع في العالم فتهاجم الممرضات الفطرية المستوطنة للتربة هذه المحاصيل وتسبب تعفن البذور قبل الانبات او البادرات بعد الانبات (Gohel et al , 2006) . فتعد عملية التحديد المبكر للممرضات الفطرية في البذور او النبات الام غير متواجدة (etal , 2012 Capote) .

يعد فطر *Rhizoctonia solani* من الفطريات الانتهازية المستوطنة في التربة المزروعة وغير المزروعة مسببا امراض عديدة للمحاصيل تؤدي لخسائر اقتصادية كبيرة في جميع انحاء العالم لاكثر من 2000 محصول وخسائر تقدر ب 30% سنويا للبلدان المتقدمة و 50% للنامية (AL Raji , 2013) .

اذ يسبب هذا الفطر تعفن الجذور الطري (soft root rot) و التساقط (damping off) وذلك لانتاجه انزيمات فعالة منها cellulase و pectinase (Mondal et al , 2013) . ولقد اعطت بكتريا *Pseudomonase aeruginosa* دورا مميزا في مكافحة الحيوية اذ تثبتت نمو *Macrophomina phaseolina* و *Fusarium solani* وغيرها واعطت دعم جيد للمحاصيل المصابة بهذه الممرضات (Tariq et al , 2014) .

كذلك كان لخميرة *Kluyvermyces marxianus* دورا حيويا مهما في مكافحة *Aspergillus strains* اذ تثبتت انتاج سموم الافلاتوكسين خاصة بعد الحصاد على مختلف المحاصيل (Peena et al , 2004) . ونظرا لقدرة هذا الفطر على احداث الاصابة خاصة التعفن الطري للجذور وتساقط البادرات لعدد كبير من المحاصيل الاقتصادية المهمة في حياة الانسان لذلك هدفت هذه الدراسة الى مايلي :

1. عزل فطر *R. solani* من جذور نبات الطماطة المصابة بالتعفن الطري .
2. تشخيص هذه العزل مظهريا ومجهريا والكشف عن قدرتها الامراضية بالاعتماد

أخذت الاطباق الحاوية على المزارع الخام لفطر *R.solani* وتم اضافة 1 مل لكل طبق من مزرعة سائلة لخميرة *k.marxianus* بتركيز 10^8 خلية / مل بعمر 48 ساعة منمأة على الوسط الزراعي السائل (NYDB) nutrient yeast dextrose broth الذي حضر باضافة 8 غم yeast + nutrient broth 5 غم extract + 20 غم dextrose الى لتر ماء مقطر معقم وبالنسبة لبكتريا *P.aeuroginosa* اضيف 1 مل من مزرعة سائلة لهذه البكتريا بتركيز 10^8 مل/خلية بعمر 48 ساعة منمأة على الوسط الزراعي السائل nutrient broth

(NB) والمحضر حسب تعليمات شركة Abuzar (2013) Himedia (india) ولقد اجريت التجربة ثلاث مرات لكل معاملة , تم حضن الاطباق الخاصة بالخميرة بدرجة حرارة 28 ± 2 م° لمدة 48 ساعة والخاصة بالبكتريا في 30 ± 1 م° لمدة 48 ساعة بعدها تم قياس اقطار المستعمرات كل 24 ساعة ولغاية امتلاء اطباق المقارنة بالنمو الفطري للـ *R.solani* تم حساب النسبة المئوية لتثبيط الفطر *R.solani* وكما يلي :

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{متوسط قطر المقارنة}}{\text{متوسط قطر المعاملة}} \times 100 \%$$

(Abuzar , 2013).

3-Protease: تم الكشف عنه باستخدام وسط Caseine Soluble Medium الحاوي على 40 dextrose غم + 10 Peptone غم + Agar 15 - Agar غم + 3 yeast extract غم + casein 8 غم + 1000 مل من الماء المقطر المعقم, لقح الوسط وحضن في 28 م° لمدة 5-7 ايام ,

ظهور مناطق واضحة حول المستعمرة يظهر فعالية Protease (, Benetez et al 2004).

4- Lipase حضر الوسط الخاص به من 10 peptone غم + 5 Na cl غم + 2 Cacl 0.1 H2O غم + Agar - Agar 20 غم + 1000 مل ماء مقطر معقم , لقح الوسط وحضن في 28 م° لمدة 4 ايام , ظهور مناطق واضحة حول المستعمرات تشير لفعالية Lipase (Benetez et al , 2004).

5- تأثير الخميرة و البكتريا موضوع الدراسة على انبات الابواغ لفطر *R.solani* تم تنمية الخميرة *K.marxianus* في وسط nutrient yeast dextrose (NYDB) broth وتم تعقيم الراشح بامرار هذه المزرعة السائلة وبعمر 48 ساعة من خلال مرشحات غشائية بقطر 0.45 m µ اما بكتريا *P. aeruginosa* فنميت على وسط (NB) nutrient broth السائل وعقمت كما ورد في تعقيم مزرعة خميرة *K.marxianus* بعدها تم نقل 5 مل من عالق الخميرة وعالق البكتريا

4-الكشف عن الانزيمات المرضية والمنتجة من قبل الفطر *R.solani* : تم من خلال قدرته على انتاج الانزيمات المهمة في الامراضية وهي :

1- cellulase: استخدم الوسط الاتي : Na 0.2 No3 غم + 4 KH2Po 0.1 غم + 0.05 KCL غم + 0.02 Mg So4 غم + 0.05 yeast extract غم + Agar - Agar 20 غم + 1000 مل ماء مقطر معقم , يلحق الوسط بالفطر *R.solani* ويحضن في 28 م° لمدة 2 - 4 يوم بعدها غطي السطح ب 1% من محلول مائي Hexadecyl trimethyl ammonium bromide (2008) (Elsamawaty et al).

2-Pectinase: حضر الوسط الملائم لانتاجه وفقا لما ورد في Handwad (1980) وذلك باضافة 2.64 غم من 0.14 Mg So4 + NH4 2So4 غم + 0.34 KH2 PO4 غم في 1000 مل من الماء المقطر المعقم واضيف اليه بكتين الحمضيات (citrus) كمصدر للكربون , لقح الوسط بثلاث قطع بقطر 6mm من وسط PDA النامي عليه فطر *R.solani* والمحضون في حرارة 25 م° لمدة 48 ساعة كما استعمل كاشف Arsenate mlybdate reagent للكشف عن السكر اذ يظهر باللون الاحمر (Kossem and Nannipieri , 1995).

الطماطة فهو يملك القدرة لاختراق الانسجة الرخوة اذ يبقى حي على الطماطة (Haggag and EL Gamal , 2012).

ذكر (Nayebyazdi *etal* (2013) ان انزيم cellulase يحلل مائيا cellulose فيتحطم متحولا الى كلوكوز , اما انزيم pectinase يحلل مائيا pectin والذي هو بولي سكر ايد تركيبى يتواجد في الجدار الخلوي الاولي للنبات (Alghalibi *etal* , 2015) , اذ تمتلك انزيمات التحطيم للجدار الخلوي خاصة وهي pectolytic , pectinesterase , pectatylase , polygalacturonase اهمية في استعمار الانسجة اضافة الى دخول الممرض (Gagera *etal* , 2013).

ولقد تبين في دراستنا انتاج عالي لل pectinase و cellulase خلال 48 ساعة اما protease فلقد انتجته بشكل معتدل خلال 72 ساعة ولم ينتج انزيم lipase من قبل هذا الفطر ولقد كانت نتيجة (Tan *etal* , 2010) مطابقة لنتيجتنا .

كما ينتج فطر *R.solani* انزيم collagenase والذي يحلل الكولاجين محولا اياه الى اجزاء صغيرة (Anthony , 1995). كما ان الانزيمات هي مواد ايسية خارج خلوية تؤثر على الغشاء الخلوي للفطر الممرض وتغيير نفاذيته فتملك بذلك الفعالية في مكافحة الحيوية من خلال انتاجها اذ تحلل مائيا الاواصر وتحطم (acetyl D glucosamin N) و (B1 , 4 glucoside) المتواجدة في البوليمرات (Daes *etal* , 2011).

بتركيز 10^8 خلية / مل وراشح الخميرة والبكتريا ووضعت في انابيب اختبار معقمة منفصلة وعلمت ثم تم اضافة 1 مل من عالق ابواغ الفطر *R.solani* بتركيز 10^8 خلية / مل , حضر باضافة 10 مل من الماء المقطر الى مزرعة الفطر *R.solani* بعمر 17 يوم تم تنميته على وسط PDA للانابيب الحاوية على عالق وراشح الخميرة والبكتريا .

ثم تم التحريك بلطف بوساطة قضيب زجاجي معقم بعدها سحب بواسطة ماصة معقمة وتم حساب التركيز باستخدام شريحة العد Haemocytomet ما المقارنة فاستخدم عالق ابواغ الفطر *R.solani* وحضنت بحرارة 28 م لمدة 12 ساعة , بعدها حسب 100 بوع مجهرية ومن كل مكرر ثم حسبت النسبة المئوية للابواغ ولقد تم اجراء هذه التجربة بثلاثة مكررات لكل معاملة (صالح وسلمان , 2015).

النتائج والمناقشة

1- الكشف عن الانزيمات الامراضية للفطر *R.solani*

يتبين من جدول (1) قدرة الفطر *R.solani* على انتاج بعض الانزيمات المهمة في الامراضية ومنها , pectinase , cellulase , protease , اذ يسبب هذا الفطر امراضا مهمة للفواكه والخضراوات خاصة الطماطة فيصيب البذور , الازهار , الجذور , الساق والثمرة كذلك يصيب اشجار الغابات اذ سببت امراض تعفن الجذور وتساقط البادرات الى خسائر تصل الى 10-80% في العالم , يتغذى الفطر *R.solani* على المواد العضوية المتحللة فيهاجم محصول

جدول (1) بعض الانزيمات التي ينتجها فطر *R.solani* والمهمة في الامراضية

الممرض <i>R.solani</i>	Cellulase	Pectinase	Protease	Lipase
انتاج الانزيم	+	+	+	-
المدة اللازمة للانتاج	48 ساعة	48 ساعة	72 ساعة	72 ساعة

لمدة 18 يوم , وايضا في حرارة 25 م لمدة 17 يوم , كذلك كان النمو الامثل في 30 م لمدة 16 يوم لكنه لا ينمو في حرارة (35 , 45 , 40) لمدة 14 يوم وفي حرارة 50 م لم ينمو الفطر ولمدة 26 يوم ولقد كانت نتيجتنا مقارنة لنتيجة

2-تأثير درجات الحرارة وعمق التربة في نمو فطر *R.solsni* يتوضح من جدول (2) ان هذا الفطر لا ينمو في درجة حرارة 10 م لمدة 27 يوم , ينمو في 12 م لمدة 20 يوم , والنمو الامثل له كان في 20 م

عمق 15cm ووجد (Daes *etal* 2011) ان القضاء على فطر *R.solani* قد وصل لديه الى 94% في حرارة 40م فما فوق .

(Gilmar *etal* 2007) كذلك لنتيجة (Suryadi *etal* , 2014).
واشار (Gilmar *etal* 2007) الى ان الفطر يقتل في 35- 38 م لمدة 14 يوم ولايعزل في

جدول (2) تاثير درجات الحرارة على نمو فطر *R.solani*

الممرض	تواجد الفطر في ا عماق التربة مقاسا ب (cm)	نمو الفطر	درجات الحرارة	الفترة المثلى للنمو
<i>Rhizoctonia Solani</i>		-	10 م	27 يوم
		+	12 م	20 يوم
	1cm	++	20 م	18 يوم
	4cm	++	25 م	17 يوم
	7cm	++	30 م	16 يوم
	10cm	-	35 م	14 يوم
	13cm	-	40 م	14 يوم
	16cm	-	45 م	14 يوم
		-	50 م	26 يوم

لايوجد نمو , + نمو جيد , ++ نمو جيد جدا, (-) لايتواجد في هذا العمق.

في الجدار الخلوي للفطريات فتحطمه كما انها تعزز دفاعات النباتات ضد الفطريات , وتعتمد قدرتها على التثبيط على كمية الانزيم المنتج من قبل السلالة البكتيرية وفعالية الانزيم تختلف حسب pH والحرارة اذ وصلت نسبة التثبيط في هذه الدراسة الى 60% (Siddiqui and Haque, 2000) . كما انها تنتج مضادات حيائية ضد الفطريات وتنتشر في البيئة الزراعية بسرعة مولدة تغيرات جينية في الفطر (Sultana *etal* ,2005).

وذكر (Abuzar 2013) ان هذه البكتريا اختزلت نسبة الاصابة بتعفن الجذور فاعطت زيادة في النمو الخضري للنبات وذلك لانتاجها Indole acetic acid , واختزلت هذه البكتريا وبمعنوية مرض تعفن البذور كذلك تعفن ولطخة الساق (Nayebyazdi *etal* ,2013) , كما تفعل الانزيمات ضد الاكسدة فيعطي للنبات مقاومة كبيرة للأمراض الفطرية (Kabir , 1999) , وامتلك القدرة على التحفيز لانتاج (polyphenols) Shafique *etal* , 2015 .
واشار (Barco 2010) الى ان هذه البكتريا تبقى حية في الجذور والساق اذ سببت انتاج معنوي للطماطة , وبلغت نسبة التثبيط ضد هذا الفطر الى 37 % في دراسة (Vanitha and

3- تاثير الخميرة *K.marxianus* وبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* في تثبيط فطر *R.solani* في الوسط الزراعي
اظهرت بكتريا *P.aeruginosa* تفوقا معنويا عاليا عند مستوى احتمالية (0.05) في تثبيط فطر *R.solani* اذ وصلت نسبة التثبيط الى 100% على الوسط الزراعي PDA عند استعمال عالق البكتريا بتركيز 10^8 خلية/مل , اما خميرة *K.marxianus* فقد اعطت تفوق معنوي جيد في التثبيط اذ وصلت نسبة التثبيط الى 88% عند نفس مستوى الاحتمالية اما المقارنة فكانت نسبة التثبيط 0.0% جدول (3).
وقد قاربت نتيجة هذه الدراسة النتيجة التي وصل اليها ((Mao *etal* , 2012) اذ بلغت نسبة التثبيط لديه لخميرة *K.marxianus* 100% , اي ان بكتريا *P.aeruginosa* تفوقت على خميرة *K.marxianus* في تثبيط الفطر الممرض , فهي تملك القدرة لتوفير ميكانيكيات متعددة لانتاج المواد السامة والتي تثبط نمو الفطريات المختلفة بمستوى كبير , لذلك امتلكت دور كبير كسيطرة ايجابية فعالة (Shafique *etal* , 2015).

كما ان هذه البكتريا تنتج كميات جيدة من glucanase المحلل لل glucane والمتواجد

الجذور , كذلك انتاج الفوسفات والامونيا التي تعزز ذلك (Kishore *etal* , 2005) , كما تملك هذه البكتريا قدرة تثبيطية ضد فطر *R.solani* ادت الى زيادة انبات بذور الطماطة فلقد وصلت الى 71% وازدياد محصول الطماطة فاستعملت ك biocontrol و biofertilizers (Deshwal, 2012) . وذكر (Schisler *etal* (1995) ان هناك جينات تشفر لثلاث مواد ايسوية ثانوية تؤدي لفقدان الممرض لعوامل الفوعة والضراوة المسببة للأمراض , وخفضت هذه البكتريا من موت البادرات اذ تكون مثبطة للغزل الفطري ومحافظة على حيوية البذور (Geng *etal* , 2011) , لذلك فان معاملة البذور والتربة مع عوامل السيطرة الحيوية تساهم في ادارة ايجابية للممرضات الفطرية (Sarup *etal* , 2007) , ونظرا لاستعمار هذه البكتريا التربة الزراعية وغير الزراعية فهي تستخدم تقنية الضغط الميكانيكي نتيجة لنمو الانبوب الجرثومي واصابته للعائل (Anthony , 1995) .

(Ramjegathesh , 2014) الى 37%. وقد اعطت هذه البكتريا سيطرة عالية على امراض عفن الجذور (Mansor *etal* , 2007) , كما اختزلت التساقط وحسنت نمو البادرات مع الوزن الطري والجاف وانتجت مواد ايسوية فعالة في مكافحة مثل , estragole , gentisi cuminaldhyde , acid geldanamycin (Sasirekha and , 2012) (Shivakumar) . وذكر (Loper *etal* (2007) ان بكتريا *P.aeruginosa* تنتج انزيم 3 , 1 B gluconase الذي يمتلك فعالية تحليلية ضد مدى واسع من الممرضات الفطرية اذ يعمل على تحليل الغزل الفطري (Babu and , 2013) Paramwgeetham, و اشار (Sultana *etal* الى ان هذه البكتريا تثبط وبشكل عالي نمو الغزل الفطري عن طريق انتاج بعض المواد والصبغات , siderophore , valatiles و pyocyanin , flucorescein والتي عززت النمو الخضري وقللت من عفن

جدول (3) تأثير بكتريا *P.aeruginosa* وخميرة *K.marxianus* في تثبيط نمو فطر *R.solani*

معدل قطر المستعمرة cm	النسبة المئوية للتثبيط %	الاحياء المجهرية المستخدمة في المعاملات
0.0	%100	<i>P.aeruginosa</i>
0.6	%88	<i>K.marxianus</i>
9	%0.0	Control(<i>R.solani</i> only)
2.6		LSD = 0.05

, R . ولم يظهر عالق *P.aeruginosa* فرقا معنويا عن راشحها في خفض اطوال الانابيب اما معاملة المقارنة فكانت نسبة الانبات للابواغ 97% اما معدل اطوال الانابيب الجرثومية فكان 25%. كما ان هذه البكتريا تقلل من انبات الابواغ فتختزل الممرضات واتفقت نتيجة هذه الدراسة فيما يخص *K.marxianus* مع ما جاء في (Mucciilli and Restuccia , 2015) , اذ تثبطت الخميرة انبات ابواغ فطر *digitatum* *Penicillium* المسبب للعفن الاخضر على ثمار اللالنكي و البرتقال (Hankin and , 1975) Antagnostakis . واثبتت دراسة (Muccilli and Restuccia , 2015) قدرة خميرة *K.marxianus* في تثبيط

4- تأثير بكتريا *P.aeruginosa* وخميرة *K.marxianus* في انبات الابواغ للفطر *Rhizoctonia solani* والانابيب الجرثومية يتوضح من الجدول (4) ان عالق البكتريا تركيز 10^8 خلية /مل وراشحها قد ساهم في تثبيط انبات لبواغ الفطر *R.solani* بالكامل 0.0 % , اما العالق لخميرة *K.marxianus* فقد كانت النسبة 2.1% ومعدل اطوال الانابيب الجرثومية 8 مايكرومتر اما راشح الخميرة فكان التثبيط لانبات ابواغ الفطر 2.2 % اما معدل اطوال الانابيب فوصل الى 9 مايكرومتر اذ كان لعالق البكتريا وراشحها تفوق معنوي عند $P=0.05$ على خميرة *K.marxianus* في خفض معدل اطوال الانابيب الجرثومية للفطر *solani*

التركيز العالية من ethanol وانتاج السموم القاتلة.

اذ تؤثر هذه الخميرة على نمو قمة الهايفا واستطالة الانبوب الجرثومي للفطريات الممرضة فهي مثبطة للهايفات بنسبة 40% كما تسيطر على السلالات السامة فيتوقف انتاج السم بعد التداخل بين الخميرة والفطر الممرض فتملك الخميرة بذلك قيمة معنوية وعملية في السيطرة الحيوية فامتلكت هذه الخميرة نسب عالية من التثبيط اذ تختزل Aflatoxins وOchratoxin وتخفض قابلية الممرض لانتاج السموم (Peena et al, 2004).

نمو الابواغ ومعدل الاستطالة للانابيب الجرثومية لمختلف السلالات العائدة لجنس *Aspergillus* , كما ان هذه الخميرة منتجة لانزيمات *exoinulinase* , *fructahydrolase* , محللة مائيا *inuline* المتواجد في الفطريات الى *fructose* و *glucose* مما يعزز قدرتها على الاصابة والسيطرة على الممرضات مابعد الحصاد لذلك هي تملك مستقبلا في مكافحة الحيوية لان متطلباتها الغذائية بسيطة ومن ميكانيكية السيطرة هي التنافس على المغذيات , التغير في pH الذي ينتج الحوامض العضوية , تحمل

جدول (4) تأثير بكتريا *P.aeruginosa* وخميرة *K.marxianus* في انبات ابواغ الفطر *R.solani* واطوال انابيب الانبات

المعاملات	النسبة المئوية لانبات الابواغ %	اطوال انابيب الانبات (مايكرومتر)
عالق بكتريا <i>P.aeruginosa</i>	0.0	0.0
راشح بكتريا <i>P.aeruginosa</i>	0.0	0.0
عالق خميرة <i>k.marxianus</i>	2.1	8
راشح خميرة <i>K.marxianus</i>	2.2	9
Control (<i>R.solani</i>)	97	25
LSD= 0.05	1.8	0.9

Al-Rajhi , A.M.H. (2013). Purification and characterization on extra. Cellular poly galacturonase from *Rhizoctonia solani* W.App.Sci. J.21(4): pp 476-484.

Abuzar , S.(2013).Antagonistic effects of some Psedumonas strains against root rot fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* and root knot nematode *Meloidogyne incognita* on chili *Capsicum annum*. World . Appl. Sci. J. 27(11): pp 1455- 1460.

Anthony ,P.K. (1995). Reduction in inoculums density of

المصادر

صالح , ناهدة مهدي وسلمان , نادية حنون. (2015). تقويم فاعلية الخميرة

Kluyveromyces marxianus وحامض السالسلك في مكافحة العفن الاخضر في البرتقال , مجلة العلوم الزراعية العراقية , مجلد (46) , عدد (2) , ص 246- 253

AL-Galibi , S.M.S; Abdulla , Q.Y.M. and Alzegry , Q.M.(2015). Mycobiotia.

associated with Yemeni mummies and their extracellular enzyme abilities. Second international conference on basic and abblid mycology . De. Biology , University Sanaa ,Yemen.

- detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance .Plant pathology .Generalitat valenciana ,Spain Moncade Valenciana .(151): p 1 -5.
- Collee , J.G. ; Fraser , A.G.; Marmion , B.P. and Simmons , A.S.(1996). Practical medical microbiology . 14 th - ed. Churchill living ston, New York.
- Cruikshank, R. and Handwad , C.C.(1980). Detection of pectic enzyme in pectin acrylamde gels .Bio.Chem.107:pp 177 - 181.
- Daes, J.; Maeyer , K.D.; Ferrez , I; Dietrich , L.E.P.; Mavrodi, D.V. and Tloft, M.(2011). Biological control of Rhizo root rot on bean by phehazine and cyclic lipopeptide produsing Pseudomenal (CMR) American. Phyt. Path.Scoi. Corresponding author 101 (8) : p997.
- Deshwal , V.K. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* as biological control agent against plant pathogenic fungus *Sclerotina sclerotiora* .Int.J. Plan.Anim. Envi.Sci.2(1): p 1.
- EL- Samawaty , A. ; Omar , M. ; Abdel - Elsalam , K.A. and Amal , A.A. (2008). Anastomosis groups , pathogenicity and cellulase production of *Rhizoctonia solani* from cotton . Pest technology .Global science books. Agriculturel research center , Plant pathology research in Giza , Egypt and King Saud university , Botany *Rhizoctonia solani* and control of belly rot on pickling cucumber with salarization .Coastar .Res. Edu.Center .Charleston.Plant.Dis. 79(12) :pp1213 - 1219.
- Babu,G. P. and Paramwgeetham ,C.(2013).Biocontrol of *Sclerotium rolfsii* apolyphagous plant pathogen by *Psedumonas aeruginosa* isolated from forest litter .Int.J.Res.Plan.Sci.3(10):pp 1-4.
- Bakthavate ,S. ; Shvakumary , S. and Sullia , S.B. (2013) . Moleculare detection of antibiotic related genes from *P.aeruginosa* Fb6 and antagonistic toward *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioi* . Turkish .J. Bio. .37: pp 289-295.
- Barco,A.M.; Hsiang, T. and Goodwin , P.H. (2010). Induced systemic resistance against foliar diseases of *Agrostis stolonifera* by (2R,3R) .Butanediol or anisoparaffin school of environmental science university of Guelph,Ontario, Canada:p 2.
- Benetez , T. ; Rincon , A.M. ; Limon , A.C. and codon , A.C.(2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International microbiology .De.Gene.University of Sevilla , Spain.7: 249- 260.
- Capote , N.; Pastrana , A.M.; Aguado, A. and Torres ,P.S. (2012). Molecular tools for

- characterization
.Indian.J.Bio.Tech.7 : 333- 340.
- Hammed , A. (1975). Contribution to the study of fungi pathogen for termites.Pak.J.Phyto.Path.6:pp 13-16.
- Hankan, L.; zucker , M. and Sands ,D.C. Bauer, A. W.; Kirbay, W. A. M.; Sherris, J. S. and Turk, M. (1971). Improved solid medium for the detection of pectolytic bacteria .Appl.Micro.22: pp 205- 209.
- Kabir ,N.Z.(1996). Selection of effective antagonists against *Rhizoctonia solani* (AG3) ,the causal agent of Rhizoctonia disease of potato .Master degree of science .Dep.plant science .McGill university ,Montreal ,Canada :p1- 3.
- Karpagam , S.A.; Sudhakar, T. and Lakshmipathy , M. (2013). Microbicidal response of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* toward clinical isolates of fungi .Int.J.Pharm.Sci.5(3): pp 870- 878.
- Kishore , G.K.; Pande, S.; Rao, J.N. and Podile, A.R.(2005). *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the plant cell wall degrading enzymes of *Sclerotium rolfsii* and reduces the severity of groundnut stem rot.Euro.J.Plant.Path.113: pp 315- 320.
- Kossem , A. and Nannipieri , P. (1995). Soil cellulase activity methods .Int.Appl.Micro. Bio.Chem. Academic press ,Sandiego.pp 345 -350.
- and Microbiology department ,Riyadh , Kingdom of Saudi Arabia . P: 118.
- Gajera H.; Domadiya , R. ; Patel , S. ; Kapopara , M. and Gglakiya, B.(2013).Molecular mechanism of Trichoderma as biocontrol agents against phytopathogen system areview . Current research in microbiology and biotechnology .Aizeon publishers .Junagadha agricultural university Gujarat, India.1(4): PP 133 - 142.
- Geng,P. ; Lai, K. ; Qu.F.; Zhang, Y.(2011). Combination of *K.marxianus* and sodium bicarbonate for controlling green mold of citrus fruit .Int.J.Food.Micro.151: pp 190-194.
- Gilmar , P.H.; Carlos , A. ; Lopes , A. and Ailton ,R. (2007) . Anovel post harvest rot of okra pods caused by *Rhizoctonia solani* in Brazil .Fito .Path. Brazil . 32: pp 237 -240.
- Gohel ,V. ; Singh , A. ; Vimal , M. and Chhatpar , H.S.(2006). Boprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms . Afr . J.Bio.Tech. 5(2) : pp 54- 72.
- Haggag, K.H.E. and EL- Gamal , G. (2012). In vitro study on *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* isolates causing the damping off and root rot diseases in tomatoes .Nat.Sci.10(11):pp 1-3.
- Hamdy , H.S. (2008). Extracellular collagenase from *R.solani* ,production ,purification and

- Nayebyazdi, N.; Salary, M.; Ghanbary, M.A. and Bahmanga, M.A. (2013). Enzyme activity in *Trichoderma reesei* and *Rhizoctonia solani*. *Africa-Eurasian. J. Agri. Envi. Sci.* 13(8) :pp 1098-1103.
- Peena, M.L.; Nesci, A. and Etcheverry, M. (2004). In vitro studies on the potential for biological control on *Aspergillus section flavi* by *Kluyveromyces* spp. *Letters. Appl. Micro.* 38: 257-264.
- Reddy, M.S.; Faylon, P.S.; Batchelor, D.; Sayyed, R.; Kumary, K.V. and Gopalkrishna, S. (2014). Recent advances in biofertilizers and biofungicides (PGPR) for sustainable agriculture. *Cambridge scholars and publishing* 13: pp 978-1044.
- Sarup, S.R.; Dhal, W.R. and Puri, M. (2007). Partial purification and characterization of exoinulinase from *K.marxianus* YS1 for preparation of high fructose syrup. *J. Micro. Bio. Tech.* 17(5): pp 733-738.
- Sasirekha, B. and Shivakumar, S. (2012). Multifarious antagonistic potentials of rhizosphere associated bacterial isolates against borne diseases of tomato. *Asia. J. Plan. Sci. Res.* 2(2) : pp 180-186.
- Schisler, D.A.; Kurtzman, C.P.; Bothast, J.R. and Slininger, Loper, J. E.; Kobayashi, D.Y. and Paulsen, I. T. (2007). The genomic sequence of *Pseudomonas fluorescence* PF5: Insights into biological. *Nat. Appl. Bio. Micro.* 97:233-238.
- Mansoor, F.; Sultana, V.; and Haque, S.E. (2007). Enhancement of biocontrol potential of *Pseudomonas aeruginosa* and *paecilomyces lilaceinus* against root rot mungbean medicinal plant *Launaea nudicaulis* L. *Pak. J. Bot.* 39(6) :pp 2113-2119.
- Mao, B.; Song, W.; Chen, S. and Deba, L.I. (2012). Modification of membrane lipid peroxidation and antioxidant enzyme activation in transgenic rice resistant to *Rhizoctonia solani*. *Afric. J. Bio. Tech.* 11(21) :pp 4141-4148.
- Mew, T.W. and Gonzales, P. (2010). A handbook of rice seed borne fungi. *PP*: 1-165.
- Mondal, A.; Dutta, S.; Kuiry, P.; Chakraborty, D.; Nandi, S.; Das, S.; Ray, S.K. and Chaudhuri, S. (2013). The biochemical constituents and pectinase activities associated with the virulence of *Rhizoctonia solani* isolates in rice in west Bengal, India. *Afric. J. Agri. Res.* 8(23): pp3029-3035.
- Muccilli, S. and Restuccia, C. (2015). Bioprotective role of yeasts. *J. Micro.* 3: pp 588-611.

- Samudra , I.M. and Mubarik , N.R.(2014). Characterization of bacterial isolates producing chitinase and glucanase for biocontrol of plant fungal pathogens. J.Agric.Tech.10(4).pp 983- 999.
- Tan, G.H. ;Nordin , M.S. and Napiah , A.B.(2010). Identification of potential bacteria controlling pathogenic fungi *Rhizoctonia solani* in rice. J.Trop.Agric.Sci.38(2) : pp 249-256 .
- Tariq , S. ;Shafiqe , H.A. ;Sultana ,V. and Haque, S.E. (2014). Management of root rot disease of wheat with endophytic plant growth promotin *Pseudomonas* with healthy wheat roots.Int.J.Bio.Res.2(1): pp 39-43.
- Vanitha , S. and Ramjagathesh,R .(2014).Biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* against coleus root rot disease.J.Plant .Path.Micro.5: p1.
- Velusamy, P. and Kim ,K.(2011) . Chitinolytic activity of *Enterobacter* sp. KB3 antagonistic to *Rhizoctonia solani* and its role in the degradation of living fungal hyphae .Int.Res. Micro.2(6): pp 206 -214.
- P.J.(1995). Evaluation of yeast for biological control of *Fusarium* dry rot of potatoes Nat.Cent.Agric.Uti.Res. Peoria fermentation biochemistry research unit.:p 25.
- Shafique,H.A.; Sultana , V.; Ara, J.; Haque,S. and Athar,M.(2015). Role of antagonistic microorganism and organic amendment in stimulating to defense system of okra against root rotting fungi .Polish.J.Micro.64(2) pp 157-162.
- Siddiqui, J.I. and Haque,E.(2000). Use of *Pseudomonas aeruginosa* for the control of root rot -root knot disease complex in tomato soil borne .28: pp 189- 192.
- Sindhu ,S.S. ; Rakshiya , R.S. and Sahu , G. .(2004). Role of biocontrol agents for disease management in sustainable agriculture .Res. Indianpublic .Bio.Cent.Soil borne .Plan. Path.Rhizosphere bacteria .Dep.Micro.Agric.Univer.Hisar, India: pp1- 5.
- Sultana ,V.; Haque, E.; Ara , J. and Athar , M.(2005). Comparative efficacy of brown ,green and red seaweed in the control of root infecting fungi and okra.Int.Envi.Sci.Tech.2(2) : pp 129..132.
- Suryadi , Y.; Susilowati , D.N.; Lestari , P.; Priyatho , T.P.;

The Effect of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteria and Yeast of *Kluyveromyces marxianus* in Growth of *Rhizoctonia solani* Fungi in Laboratory and Different Temperature and Campestral Deep of Soil .

Ebtesam Thamer Jeaz
College of Education .University of
Al-Qadisiyah

Abstract

This study has been conducted to evaluate the efficacy of the yeast *K.marxianus* and *P.aeruginosa* bacteria separately against *R.solani* caused root rot , *P.aeruginosa* show high efficacy as a biological agent against *R.solani* on PDA with 100% inhibition at 10^8 cell/ ml.

In addition , *K.marxianus* in concentration 10^8 cell/ ml inhibited *R.solani* growth at 88 % as compared with 0.0% in control , *P.aeruginosa* suspension at 10^8 cell/ml and its filtrate inhibited spores germination and rate of germ tubes length to 0.0 of *R.solani* completely .

K.marxianus suspension at 10^8 cell/ml inhibited spores germination with 2.1% , rate of germ tubes length reach to 8 micrometer while *K.marxianus* filtrate 10^8 cell/ ml inhibition germ germination with 2.2% , rate of germ tubes length reached to 9 micrometer while control (*R.solani*) germ germination reach to 97% , germ tubes length with 25 micrometer .

R.solani Produces three enzymes helped of pathogenicity (pectinase, cellulose and protease) without lipase .These fungus not growth in temperatures 10 c to 27 day , at the temperatures (35, 40, 45)c to 14 day and in temperature 50 c to 25 day but *R. solani* fungus growth in temperature 12 c to 20 day while optimum growth of fungus is in 20 c to 18 day , 25 c to 17 day and 30 c in 16 day . *R.solani* founded in depth (1,7,10,13) cm but if is not founded in depth 16 cm .

Key Words : *Kluyvermyces marxianas* , *Pseudomonas aeruginosae* , *Rhizoctonia solani* .