دراسة تاثير بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وخميرة *Kluyveromyces marxianus* في نمو فطر *Rhizoctonia solani* مختبريا ودرجات الحرارة المختلفة وعمق التربة حقليا

ابتسام ثامر جعاز
جامعة القادسية / كلية التربية
E.Mail : Ebtesam thamer96@yahoo. com

تاريخ استلام البحث : 2015/11/18 تاريخ قبول النشر : 2016/3/24

الخلاصة

تم اجراء هذه الدراسة بهدف التعرف الى كفاءة خميرة *Kluyveromyces marxianus* وبكتريا *Psedumonas 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 الزرعي PDA اذ بلغت نسبة التثبيط 100% بتركيز 10^8 خلية/مل اما خميرة *K.marxianus* فلقد ثبطت نمو الفطر بنسبة 88% في حين كانت 0.0% في معاملة المقارنة , ان كل من عالق وراشح بكتريا *P.aeruginosa* قد ثبط 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 ماكرومتر 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 cellulose وpectinase وprotease لكنه لم ينتج انزيم , lipase اما فيما يخص درجات الحرارة فالفطر لاينمو في حرارة 10 مْ لمدة 27 يوم كذلك حرارة (35 , 40 ,45) مْ لمدة 14 يوم ولا ينمو ايضا في 50 مْ لمدة 26 يوم وينمو في حرارة 12مْ لمدة 20 يوم لكن النمو الامثل له يكون في حرارة 20مْ لمدة 18 يوم وبحرارة 25 مْ لمدة 17 يوم كذلك 30 مْ لمدة 16يوم , 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

ان استخدام المواد الكيمياوية لغرض مقاومة الفطريات الممرضة للنبات يحمل بعض الاثار السلبية اذ تزايدت المقاومة من قبل الفطريات اما الزيادة في استخدامها سبب مشاكل في تلوث البيئة ومخاطر على صحة الانسان والحيوان (Shafique *etal* , 2015) . ذكر Reddy (2014) *etal* 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 *etal* , 2007) .

فاعطت المكافحة الحيوية ادارة وسيطرة جيدة على الامراض الفطرية وبالتالي تقليل الخسائر الاقتصادية للمحاصيل المهمة في حياة الانسان (Velusamy and Kim ,2011) . فتضمنت هذه المكافحة فعاليات جينية مضادة للفطرياتة الممرضة للنباتات (2013 , *etal* Bakthavate). فنمو rizobateria يحسن صحة التربة ويعمل على حماية المحاصيل وبشكل حيوي , اذ تعمل على استحثاث المقاومة الجهازية لدى النبات ضد الممرضات والحشرات (Shafique *etal* ,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

وhydrolytic enzymes و B1,3 glyconase و chitinase و Gibberlins المحفز لنمو النبات وتحسين دفاعات الجذور ضد الممرضات النباتية و اختزال انتاج ethylene (Sindhu *etal* , 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 *etal* , 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 لااكثر من 2000 محصول وخسائر تقدر ب 30% سنويا للبلدان المتقدمة و50% 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 *etal* , 2013). ولقد اعطت بكتريا *Pseudomonase aeruginosa* دورا مميزا في المكافحة الحيوية اذ ثبطت نمو *Macrophomina phaseolina* و *Fusarium solani* وغيرها واعطت دعم جيد للمحاصيل المصابة بهذه الممرضات (Tariq *etal* , 2014).

كذلك كان لخميرة *Kluyvermyces marxianas* دورا حيويا مهما في مكافحة *Aspergillus* strains اذ ثبطت انتاج سموم الافلاتوكسين خاصة بعد الحصاد على مختلف المحاصيل (Peena *etal* , 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 على انتاجها للإنزيمات التي تشارك في هذه العملية .
3. استخدام طريقة المكافحة الحيوية biocontrol باستخدام بكتريا*Pseudomonas aeruginosa*
4. و خميرة *Kluyvermyces marxianus* ضد هذا الممرض لبيان قدرتها على تثبيط نموه .
5. دراسة تاثير 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 هايبوكلوريت الصوديوم 1% ولمدة دقيقة وتركت لتجف (Gilmar *etal* , 2007) , بعدها اخذت قطع من الجذور وزرعت على وسط potato dextrose agar (PDA) وحضنت بحرارة 25 مْ لمدة 17يوم ثم زرعت ثانويا عدة مرات للحصول على المزرعة الخام اما بالنسبة لخميرة *K .marxianus* وبكتريا *P. aeuroginosa* فلقد عزلت من التربة المحيطة بنباتات الطماطة غير المصابة اذ اخذت من حقل غير مصاب وذلك بنثر 0.25 غم من التراب ماخوذ من عمق 10 C على اكار potato dextrose agar (PDA) وحضنت في حرارة 28مْ لمدة 7 ايام لعزل الخميرة وعلى وسط مكونكي اكار MaCconky agar في حرارة 37 مْ 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 *etal* 1996).

3-تثبيط النمو لفطر *R. solani* باستخدام بكتريا *P.aeruginosa* وخميرة *K.marxianus*

اخذت 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 48ساعة منماة على الوسط الزرعي السائل (NYDB) nutrient yeast dextrose broth الذي حضر باضافة 8 غم nutrient broth + 5 غم yeast 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 منماة على الوسط الزرعي السائل nutrient broth (NB) , والمحضر حسب تعليمات شركة Himedia (india) Abuzar (2013) ولقد اجريت التجربة ثلاث مرات لكل معاملة , تم حضن الاطباق الخاصة بالخميرة بدرجة حرارة 28 ±2 مْ لمدة 48 ساعة والخاصة بالبكتريا في 30±1مْ لمدة 48 ساعة بعدها تم قياس اقطار المستعمرات كل 24 ساعة ولغاية امتلاء اطباق المقارنة بالنمو الفطري لل, *R.solani* تم حساب النسبة المئوية لتثبيط الفطر *R.solani* وكما يلي :

النسبة المئوية للتثبيط = متوسط قطر المقارنة _ متوسط قطر المعاملة × 100 %
متوسط قطر المقارنة

.(Abuzar , 2013)

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

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

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

ظهور مناطق واضحة حول المستعمرة يظهر فعالية Protease (Benetez *etal* , 2004).

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

5- تاثير 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 µm 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

بتركيز 10^8 خلية / مل وراشح الخميرة والبكتريا ووضعت في انابيب اختبار معقمة منفصلة وعلمت ثم تم اضافة1 مل من عالق ابواغ الفطر *R.solani* بتركيز 10^8خلية /مل , حضر باضافة 10 مل من الماء المقطر الى مزرعة الفطر *R.solani* بعمر 17يوم 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 ا ما المقارنة فاستخدم عالق ابواغ الفطر *R.solani* وحضنت بحرارة 28 مْ لمدة 12 ساعة , بعدها حسب 100 بوغ مجهريا 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 cellulase , pectinase , 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 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 سكرايد تركيبي يتواجد في الجدار الخلوي الاولي للنبات (Alghalibi *etal* 2015 ,) , اذ تمتلك انزيمات التحطيم للجدار الخلوي خاصة وهي pectinesterase , pectolytic , polygalacturonase , pectatelyseاهمية في استعمار الانسجة اضافة الى دخول الممرض (Gagera *etal* , 2013) .

ولقد تبين في دراستنا انتاج عالي لل pectinase وcellulase 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 ايضية خارج خلوية تؤثر على الغشاء الخلوي للفطر الممرض وتغيير نفاذيته فتملك بذلك الفعالية في المكافحة الحيوية من خلال انتاجها اذ تحلل مائيا الاواصر وتحطم (acetyl D glucosamin N) و(4, B1 glucoside) المتواجدة في البوليمرات (Daes *etal* , 2011).

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

الممرض *R.solani*	Cellulase	Pectinase	Protease	Lipase
انتاج الانزيم	+	+	+	-
المدة اللازمة للانتاج	48 ساعة	48 ساعة	72 ساعة	72 ساعة

2-تاثير درجات الحرارة وعمق التربة في نمو فطر *R.solsni*

يتوضح من جدول (2) ان هذا الفطر لاينمو في درجة حرارة 10مْ لمدة 27 يوم , ينمو في 12مْ لمدة 20 يوم , والنمو الامثل له كان في 20مْ لمدة 18 يوم , وايضا في حرارة 25 مْ لمدة 17 يوم , كذلك كان النمو الامثل في 30 مْ لمدة 16 يوم لكنه لاينمو في حرارة (35 , 45 , 40) لمدة 14 يوم وفي حرارة 50مْ لم ينمو الفطر ولمدة 26 يوم ولقد كانت نتيجتنا مقاربة لنتيجة

(2007) Gilmar *etal* كذلك لنتيجة (Suryadi *etal* , 2014).
واشار(2007) Gilmar *etal* الى ان الفطر يقتل في 35- 38 مْ لمدة 14 يوم ولايعزل في عمق . 15cmووجد (2011)Daes *etal* ان القضاء على فطر *R.solani* قد وصل لديه الى 94% في حرارة 40مْ فما فوق .

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
Rhizoctonia Solani	1cm	+	-	10 مْ	27 يوم
	4cm	+	+	12 مْ	20 يوم
	7cm	+	+ +	20 مْ	18يوم
	10cm	+	+ +	25 مْ	17 يوم
	13cm	+	+ +	30 مْ	16يوم
	16cm	(-)	-	35 مْ	14يوم
			-	40 مْ	14 يوم
			-	45 مْ	14يوم
			-	50 مْ	26يوم

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

3- تاثير الخميرة *K.marxianus* وبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* في تثبيط فطر *R.solani* في الوسط الزرعي
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 الزرعي 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 100 *K .marxianus* % , 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 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 حياتية 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 للامراض الفطرية (Kabir , 1999) , وامتلكت القدرة على التحفيز لانتاج polyphenols) Shafique *etal* , 2015).
واشار (2010 Barco)الى ان هذه البكتريا تبقى حية في الجذور والساق اذ سببت انتاج معنوي للطماطة , وبلغت نسبة التثبيط ضد هذا الفطر الى37 % في دراسة (Vanitha and

(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 ايضية فعالة في المكافحة مثل , estragole gentisi cuminaldhyde , acid geldanamycin (Sasirekha and Shivakumar , 2012).

وذكر(2007) Loper *etal* 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 Paramwgeetham, 2013) , واشار(2005) Sultana *etal* الى ان هذه البكتريا تثبط وبشكل عالي نمو الغزل الفطري عن طريق انتاج بعض المواد والصبغات , siderophore pyocyanin , flucorescein و valatiles والتي عززت النمو الخضري وقللت من عفن 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 (1995)Schisler *etal*ان هناك جينات تشفر لثلاث مواد ايضية ثانوية تؤدي لفقدان الممرض لعوامل الفوعة والضراوة المسببة للامراضية , 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 الترب الزراعية وغير الزراعية فهي تستخدم تقنية الضغط الميكانيكي نتيجة لنمو الانبوب الجرثومي واصابته للعائل (Anthony , 1995) .

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

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

4- تاثير بكتريا *P.aeruginosa* وخميرة *K.marxianus* في انبات الابواغ للفطر *Rhizoctonia solani* واطوال الانابيب 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 8مايكرومتر 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* . *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 ماجاء في (Mucciilli and Restuccia , 2015) , اذ ثبطت الخميرة انبات ابواغ فطر *digitatum Penicillium* المسبب للعفن الاخضر على ثمار اللالنكي و البرتقال (Hankin and Antagnostakis ,1975) .

واثبتت دراسة (Muccilli and Restuccia 2015)قدرة خميرة *K.marxianus* في تثبيط

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 وglucose مما يعزز قدرتها على الاصابة والسيطرة على الممرضات مابعد الحصاد لذلك هي تملك مستقبلا في المكافحة الحيوية لان متطلباتها الغذائية بسيطة ومن ميكانيكية السيطرة هي التنافس على المغذيات , التغير في pHالذي ينتج الحوامض العضوية , تحمل التراكيز 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 وتنخفض قابلية الممرض لانتاج السموم (Peena *etal* ,2004).

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

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

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 abblied mycology . De. Biology , University Sanaa ,Yemen.

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

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 stalonifera* 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 medum 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 *Psedumonas aeruginosa* toward clinical isolates of fungi .Int.J.Phar.Sci.5(3): pp 870- 878.

Kishore , G.K.; Pande, S.; Rao, J.N. and Podile, A.R.(2005). *Psedumonas 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 ,Riyedh , 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

Loper , J. E.; Kobayashi , D.Y. and Paulsen , I. T. (2007) . , The genomic sequence of *Psedumonas fluorescence* PF5 :Insights into biological .Nat.Appl.Bio.Micro.97:233-238.

Mansoor , F.; Sultana , V.; and Haque , S.E. (2007) . Enhancent of biocontrol potential of *Pseudomonas aeruginosa* and *paecilomyces lilaceinus* against root rot mungbeay amedicinal plant *Launaea mudicaulis L*. .Pak.J.Bot.39(6) :pp 2113-2119.

Mao,B.; Song , W.; Chen, S. and Debao,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). Ahand book of rice seed born fungi .PP: 1- 165.

Mondal ,A.; Dutta , S.; Kuiry , P.; Chakraborty , D.; Nandi , S.;Das , S. ; Ray , S.K. and Chaudhur , S. (2013). The biochemical constituents and pectinase activities associated with the virulence of *Rhizoctonia solani* isolates in rice in west Bangal ,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.

Nayebyazdi, N.; Salary,M.; Ghanbary ,M.A. and Bahmanga,M.A. (2013). Enzyme activity in *Trichoderma reesei* and *Rhizoctonia solani* .Aerica -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 .Appi.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 ,

P.J.(1995). Evalution of yeast for biological control of Fusarium dry rot of potatoes Nat.Cent.Agri.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 microorganissem and organic amendment in stimulating to defense system of okra against root rooting 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. Indiapublic .Bio.Cent.Soil borne .Plan. Path.Rhizosphere bacteria .Dep.Micro.Agri.Univer.Hisat, 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.; Samudra , I.M. and Mubarik , N.R.(2014). Characterization of bacterial isolates producing chitinase and glucanase for biocontrol of plant fungal pathogens. J.Agri.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.Agri.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 Psedumonas with healthy wheat roots.Int.J.Bio.Res.2(1): pp 39-43.

Vanitha , S. and Ramjegathesh,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 *Rizoctonia solani* and its role in the degradation of living fungal hyphae .Int.Res. Micro.2(6): pp 206 -214.

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.solany* 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 lenghth 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 .*