تقويم كفاءة عزلات من البكتيريا الخيطية (Actinomycetes) في مكافحة مرض موت بادرات الخيار المتسبب *Rhizoctonia solani* Kuhn

محمد عامر فياض* ولينا كاظم عواد

قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق. *البريد الإلكتروني للباحث المراسل: muamer2010@yahoo.com

الملخص

فياض، محمد عامر ولينا كاظم عواد. 2021. تقويم كفاءة عزلات من البكتيريا الخيطية (Actinomycetes) في مكافحة مرض موت بادرات الخيار المتسبب *Rhizoctonia solani* Kuhn. مجلة وقاية النبات العربية، 39(4): 281–288. https://doi.org/10.22268/AJPP-39.4.281288

أجريت هذه الدراسة خلال الفترة 2017–2018 بهدف عزل البكتيريا الخيطية من مصادر بيئية مختلفة وتشخيصها وتقويم كفائتها في مكافحة مرض موت بادرات الخيار المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani*. تم الحصول على 28 عزلة من البكتيريا الخيطية عزلت من مصادر بيئية مختلفة، وكانت جميع العزلات موجبة لصبغة جرام ومنتجة لأنزيم الاميلز والكاتليز وتمتلك خصائص مظهرية بهيئة هيفات متفرعة. كما أظهر التشخيص الجزيئي لبعض عزلات البكتيريا المعتمد على تضخيم الجين 16sRNA ودراسة تتابعه النيوكلوتيدي أن العزلة رقم 6 المعزولة من التربة تتطابق بنسبة 99% مع العزلة *Streptomyces griseus* بينما تطابقت العزلة رقم 66 المعزولة من جذور النخيل مع العزلة *Brevibacterium celere* بنسبة 99%. حفظ تتابع القواعد النتروجينية للعزليتن في المركز الوطني الأمريكي لمعلومات التقانات الاحيائية NCBI تحت التسلسل LC501385.1 للعزلة *S. gresus* و LC501386.1 للعزلة *B. celere*. أظهرت تجربة التضاد قدرة العزلتين على تثبيط نمو الفطر *R. solani*، إذ بلغ قطر منطقة التثبيط 7 و9 مم، على التوالي، كما أظهرت النتائج كفاءة العزلتين في خفض نسبة الاصابة بمرض موت بادرات الخيار من 11.4% إلى 1 و4.7% في العزلتين *B. celere* و*S. griseus*، على التوالي.

كلمات مفتاحية: بكتيريا خيطية، *Rhizoctonia solani*، خيار، مكافحة حيوية.

المقدمة

يعد مرض موت البادرات المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* Kuhn من أهم الأمراض التي تنتشر في معظم مناطق العالم سواء في الزراعة المكشوفة أو الدفيئات البلاستيكية ويسبب خسائر قد تصل إلى 90%على بعض المحاصيل (Agrios, 2005). وأظهرت دراسات مسحية أن نسبة الاصابة بمرض موت بادرات الطماطم/البندورة المتسبب عن الفطر *R. solani* في البصرة تتراوح بين 19.7–29.1% (الرفاعي، 2004؛ الوائلي، 2004).

يصيب الفطر عوائل نباتية متعددة مثل العائلة القرعية (Cucurbitaceae)، النجيلية (Poaceae)، البقولية (Fabaceae)، الصليبية (Curuciferaceae)، الخبازية (Malvaceae) والباذنجانية (Solanaceae)، ويسبب لها أمراض تعفن البذور وموت البادرات قبل وبعد الإنبات، كما يسبب تقرح وتعفن لجذور النباتات الكبيرة وقد يصيب الأوراق مسبباً لها لفحة أو تبقعات كما يصيب الثمار اللحمية الملامسة لسطح التربة كثمار الخيار والبطيخ والباذنجان وغيرها ويصيب درنات البطاطس/البطاطا مسبباً لها ما يعرف بالقشرة السوداء (Black scarf)، ويصيب بادرات القطن مسبباً لها مايعرف بخناق القطن (Sore shin) (Agrios, 2005). وتشكل مكافحة مسببات أمراض النبات تحدياً جدياً للمهتمين في مجال أمراض النبات، وقد استخدمت طرائق عدة منها الكيميائية والفيزيائية والزراعية إلا أن صعوبة تطبيق بعضها وقلة فاعليتها اضافة إلى الأضرار الناجمة عن استخدام المبيدات الكيميائية على البيئة بشكل عام وصحة الإنسان بشكل خاص، حفز على البحث عن وسائل بديلة. وتعد المكافحة الاحيائية أحد الخيارات المرغوبة في مكافحة أمراض النبات بشكل عام والأمراض المتسببة عن كائنات تقطن التربة بشكل خاص. تعدالبكتيريا الخيطية Actinomycetes من الكائنات واسعة الإنتشار وتتميز بانتاجها العديد من المركبات النشطة حيوياً مثل Nystatin، Amphtericin، Streptomycin و Tetracyclin والتي تمتلك خصائص مضادة للفطور والبكتيريا (Barrios-Gonzales *et al.*, 2003). كما استخدمت البكتيريا الخيطية *Streptomyces* spp. في

https://doi.org/10.22268/AJPP-39.4.281288
© 2021 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

مكافحة مرض التعفن الطري وفي مكافحة الفطر *Macrophomina phaseolina* (Salah & Khalil, 1991؛ Shrivastava *et al*., 2017).

ونظراً لأهمية مرض موت بادرات الخيار ولقلة الدراسات المتعلقة باستخدام البكتيريا الخيطية في مجال مكافحة أمراض النبات في العراق فقد جاءت هذه الدراسة بهدف عزل وتشخيص البكتيريا الخيطية وتقويم فاعليتها في مكافحة مرض موت بادرات الخيار المتسبب عن الفطر *R. solani*.

مواد البحث وطرائقه

عزل البكتيريا الخيطية

جمعت عينات عشوائية من مصادر بيئية مختلفة تضمنت عينات تربة وأسمدة حيوانية وبتموس وماء وجذور نباتات مختلفة. وضعت العينات في أكياس بولي اثيلين أو قناني زجاجية معقمة بالنسبة لعينات الماء وجلبت إلى المختبر وعلمت باسم العينه وتاريخ جمعها وغيرها من المعلومات وحفظت عند درجة حرارة 4°س.

عزلت البكتيريا الخيطية من عينات التربة والأسمدة الحيوانية والبتموس باستخدام طريقة التخافيف (Abdulhamed, 2013)، أما العزل من الماء فتضمن أخذ 1 مل من كل عينه واضيف إليه 20 مل من الوسط الزرعي المستخدم في عزل البكتيريا. أما العزل من الجذور فتتضمن طريقتين الأولى تم فيها تقطيع الجذور إلى قطع صغيرة وبعد تطهيرها نقلت 3–4 قطع إلى أطباق تحوي وسط الزرع، أما الطريقة الثانية فتضمنت هرس قطع الجذور المعقمة ثم عمل سلسلة تخافيف منها. أستخدم وسط Starch Casein Broth (SCB) لعزل البكتيريا الخيطية من عينات الماء، واستخدم وسط Glycerol-Yeast Extract Agar (GYEA) لعزل البكتيريا من العينات الأخرى. حضنت الأطباق عند درجة حرارة 37°س لمدة أربعة ايام.

التشخيص المورفولوجي والبيوكيميائي للبكتيريا الخيطية

أستخدمت أوساط زرعية قياسية متعددة (وسط مستخلص الخميرة–مستخلص الشعير، وسط آجار الشوفان، وسط آجار الاملاح اللاعضوية، وسط الكليسيرول–اسبارجين آجار، وسط النشاء–الكازين، وسط الآجار المغذي، وسط الجيلاتين–المرق المغذي، وسط مرق النشاء–الكازين) لتحديد الصفات المظهرية والبيوكيميائية، وتتضمن الصفات المظهرية كثافة النمو وشكل المستعمرات ولون الغزل الهوائي والغزل داخل الوسط الزرعي وانتاج الصبغات، أما الصفات البيوكيميائية فتضمنت اختبار تحلل النشأ واختبار إماهة الجيلاتين واختبار القدرة على إنتاج أنزيم الكاتليز (Catalase) والتصبغ بصبغة جرام.

التشخيص الجزيئي لعزلات البكتيريا الخيطية

شخصت عزلتان (إحداهما من جذور النخيل والأخرى معزولة من التربة) باستخدام التفاعل التسلسلي للبوليمريز (PCR). استخلص الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين (DNA) من عزلات البكتيريا الخيطية باستعمال عدة الاستخلاص DNA extraction kit (GSYNC) المجهز من شركة Geneaid. تم قياس كمية ونقاوة الحامض النووي DNA (نانوغرام/مايكروغرام) بوساطة جهاز Nanodrop صنع شركة Thermo Scientific الأمريكية واستعمل زوج البادءات التالية:

5-ACAAGCCTGGAAACGGGGT-3 (Forward)
5-ACGTGTGCAGCCCAAGACA-3 (Reverse)

في تفاعل البلمرة المتسلسل لتضخيم الجين 16sRNA (Igbinosa *et al.*, 2017) وتضمن برنامج التضخيم 5 دقائق عند درجة حرارة 90°س لدورة واحدة للتنشيط و1 دقيقة عند درجة حرارة 94°س لخطوة المسخ (الدنترة) ودقيقة واحدة لخطوة الالتصاق وعند درجة حرارة 58°س ودقيقتين للتمدد عند درجة حرارة 72°س وتضمنت خطوات الدنترة والالتصاق والتمدد 35 دورة، أما خطوة التمدد النهائي فتضمنت دورة واحدة لمدة خمسة دقائق عند درجة حرارة 72°س.

اختبار القدرة التضادية للبكتيريا الخيطية إتجاه الفطر *R. solani*

تم الحصول على عزلة مشخصة من الفطر *R. solani* (معزولة من درنات بطاطس/بطاطا) من مختبر أمراض النبات، كلية الزراعة، جامعة البصرة. اختبرت القدرة التضادية لعزلات البكتيريا الخيطية اتجاه الفطر *R. solani* باستعمال طريقة الزرع المزدوج (Dual culture technique) حيث لقح مركز كل طبق بتري قطر 9 سم حاوي على وسط PDA المعقم بقرص 0.5 سم أخذ من حافة مزرعة نقية بعمر 4 أيام للفطر *R. solani*، ثم لقح كل طبق بأربعة اقراص قطر 0.5 سم أخذ من المزارع النقية لعزلات البكتيريا وعلى بعد 3 سم من مركز كل طبق ملقح بالفطر الممرض. حضنت الأطباق عند درجة حرارة 28°س 4 أيام، وتم قياس منطقة التثبيط بالمليمتر.

اختبار تأثير المركبات المتطايرة المنتجة من البكتيريا الخيطية في تثبيط نمو الفطر *R. solani*

لقح مركز طبق بتري قطر 9 سم حاوي على الوسط الزرعي PDA المعقم بقرص قطر 0.5 سم أخذ من حافة مزرعة حديثة للفطر *R. solani* بعمر أربعة ايام، ولقح مركز طبق بتري آخر حاوي على وسط GYEA بأحد عزلات البكتيريا الخيطية وبطريقة التخطيط. رفع غطاء طبق البكتيريا الخيطية وثبت فوقه طبق الفطر الممرض بوساطة شريط لاصق لف حول الطبقيين معاً. تضمنت معاملة المقارنة وضع طبقيين احداهما فوق الآخر ملقحة بلقاح الفطر الممرض فقط. حضنت الاطباق عند درجة

حرارة 28°س لمدة أربعة أيام (Cho *et al.*, 2017). حسبت النسبة المئوية للتثبيط وفق المعادلة الآتية:

$$\% \text{ للتثبيط في النمو} = \frac{\text{نمو الفطر في المقارنة- نمو الفطر في المعاملة}}{\text{نمو الفطر في المقارنة}} \times 100$$

تأثير بعض عزلات البكتيريا الخيطية في إصابة نبات الخيار بمرض موت بادرات الخيار المتسبب عن الفطر *R. solani*

عقم خليط تربة زراعية (جلبت من أحد مزارع أبو الخصيب) مع البتموس بنسبة 1:3 (تربة: بتموس) باستعمال محلول الفورمالين 50:1 (فورمالين:ماء)، واستعمل المحلول بنسبة 3 لتر/م^3 (طواجن، 1975). وضعت التربة في أكياس بلاستكية لمدة ثلاثة أيام لغرض تتطاير المادة المعقمة. بعد ذلك عبئت التربة في اصص بلاستيكية سعة 6 كغ (22 سم ارتفاع وقطر24 سم). أضيف لقاح الفطر *R. solani* المنمى على بذور الدخن إلى التربة بنسبة 1% وزن/وزن. ثم رطبت التربة بعد ذلك وبعد يومين أضيف لقاح ستة عزلات من البكتيريا الخيطية أثبتت كفاءتها في تجارب التضاد وهي العزلات 6، 10، 14 و 24 المعزولة من التربة والعزلات رقم 44 و66 المعزولة من جذور النخيل وبمعدل 100 مل تركيز 1×10 وحدة تكوين مستعمرة لكل أصيص. (Prescott *et al.*, 2005) بعد ذلك بيومين زرعت الأصص ببذور الخيار صنف Emparator وبمعدل 10 بذور لكل أصيص وحسبت النسبة المئوية لموت البادرات، ونسبة الاصابة وشدة الاصابة.

النتائج والمناقشة

عزل البكتيريا الخيطية

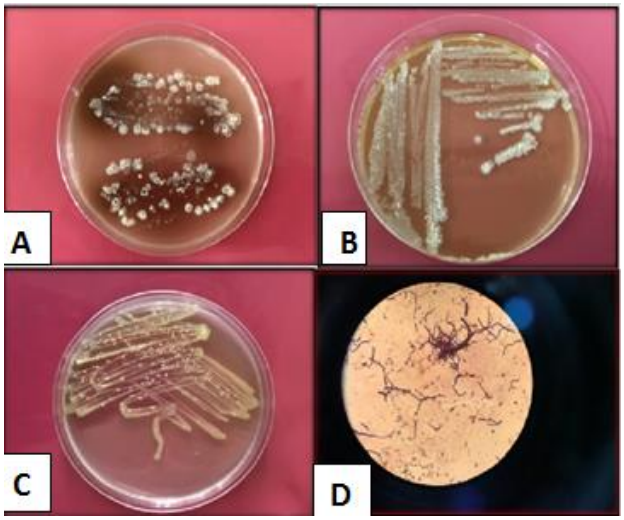
أظهرت نتائج العزل الحصول على 28 عزلة من البكتيريا الخيطية عزلت من مصادر مختلفة، منها 17 عزلة عزلت من ترب زراعية جمعت من مناطق مختلفة من محافظة البصرة وأربع عزلات من جذور النخيل وعزلتيين من جذور الباذنجان وعزلتين من سماد الأغنام وعزلة واحدة من سماد الأبقار والبتموس وماء الحنفية.

وتتفق نتائج هذه الدراسة مع ما ذكره Prescott *et al.* (2005) من أن التربة الغنية بالمواد العضوية هي البيئة الطبيعية لانتشار البكتيريا الخيطية. كما توافقت نتائج هذه الدراسة مع عدة دراسات سابقة أشير فيها إلى عزل البكتيريا الخيطية من التربة والماء والبتموس والأسمدة الحيوانية وجذور النباتات (Abussaud *et al.*, 2013؛ Inderiat & Franco, 2008؛ Kamal & Sharma, 2014).

تشخيص البكتيريا الخيطية إعتماداً على الصفات المظهرية والكيموحيوية

أظهرت جميع العزلات تفاعلاً موجباً لصبغة جرام وعند فحصها مجهرياً على قوة تكبير 40 ظهرت بشكل هيفات متفرعة ولا تحمل أبواغاً عندما تكون الهيفات داخل الوسط الزرعي، في حين تحمل أبواغاً عندما تكون الهيفات هوائية. كما أظهرت نتائج التوصيف المظهري تباين العزلات في صفاتها المظهرية، فمثلا ظهرت العزلة رقم 6 بلون كريمي في وسط Nutrient Agar في حين ظهرت بلون وردي في وسط Starch casein agar. كما أظهرت جميع العزلات كشفا موجباً لأنزيم الاميلز والكاتليز والجيلاتنيز، واستبعدت جميع العزلات التي لم تتوافق صفاتها المظهرية والبيوكيميائية مع البكتيريا الخيطية.

بشكل عام تباين شكل المستعمرات بين مجعدة وشمعية أو طباشيرية وتكون مسطحة أو دائرية أو نقطية أو تكون المستعمرات دائرية أو شبهه دائرية غائرة في الوسط. وتباينت ألوان الهيفات داخل الوسط الزرعي بين اللون الكريمي والأصفر والزيتوني والبرتقالي والبني الغامق والفاتح والوردي، أما الهيفات الهوائية فقد تباينت ألوانها بين الكريمي والابيض والرمادي والبني الفاتح والبرتقالي والوردي (شكل 1). كما تميزت عدد من العزلات برائحة تشبه رائحة التربة المبتلة (Earth odor). وتتفق هذه الصفات مع دراسات سابقة (ايليا، 2008؛ رمضان والفيل، 2013).



شكل 1. أشكال مستعمرات مختلفة من البكتيريا الخيطية، (A وB) عزليتن من التربة، (C) عزلة من جذور الباذنجان، (D) هايفات البكتيريا الخيطية مصبغة بصبغة جرام.

Figure 1. Different colonies shape of Actinomycetes, (A & B) two isolate from soil, (C) isolate from eggplant roots, (D) hyphae of Actinomycetes stained with gram stain.

التشخيص الجزيئي لعزلات البكتيريا الخيطية

أظهرت نتائج التشخيص الجزيئي لعزلتين من عزلات البكتيريا الخيطية التي تم عزلها من مصادر بيئية مختلفة. بوساطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) ومطابقة تتابعات القواعد النتروجينية للجين 16s rRNA مع التتابعات المخزونة في المركز الوطني الأمريكي لمعلومات التقانات الحيوية للجينات (NCBI)، أن العزلة 6 المعزولة من التربة تتطابق مع العزلة NBRC14886، AB184627.1 التي تعود إلى البكتيريا الخيطية *Streptomyces griseus* بنسبة تعريف 99% وبدرجة تطابق 1814 ونسبة تطابق 99%. كما وتطابقت العزلة رقم 66 مع تتابعات القواعد النتروجينية للعزلة DQ16 Ku والتي تعود إلى البكتيريا الخيطية *Brevibacterium celere* بنسبة تعريف 93% وبدرجة 1428 ونسبة تطابق 99% (جدول 1). أودع تسلسل القواعد النتروجينية للعزلتين في بنك الجينات NCBI تحت الرقم التسلسلي LC501385.1 و LC501386.1 لكليهما، على التوالي. ولقد استعملت تقانة التشخيص الجزيئي في تشخيص البكتيريا الخيطية كما هو الحال في عدة دراسات سابقة (Amin *et al.*, 2017؛ Espinosa *et al.*, 2013؛ Shrivastava *et al.*, 2017).

القدرة التضادية لبعض عزلات البكتيريا الخيطية ضد الفطر *R. solani*

أظهرت نتائج اختبار التضاد بين بعض عزلات البكتيريا الخيطية والفطر *R. solani* وبطريقة الزرع المزدوج ان عزلات البكتيريا الخيطية تمتلك قدرة تضاد متباينة اتجاه الفطر *R. solani* فقد سجلت Actinomycetes 44 و *B. celere* المعزولة من جذور النخيل أعلى قدرة تثبيطية اتجاه الفطر *R. solani* إذ بلغ قطر منطقة التثبيط 17 و15 مم، على التوالي. في حين تراوح قطر منطقة التثبيط للعزلات الأخرى بين 7–9 مم (جدول 2، شكل 2).

تتفق نتائج هذه الدراسة مع عدة دراسات سابقة أشير فيها إلى قدرة البكتيريا الخيطية في الحد من نمو عدة فطور ممرضة للنبات ومنها *R. solani*، *Macrophomina phaseolina*، *Alternari alternata* و *Fusarium solani* وغيرها (Aghigh *et al.*, 2004؛ Shrivastava *et al.*, 2017؛ Sowndharajan & Kang, 2012). تنتج البكتيريا الخيطية مضادات حيوية مثل Albocycline وأنزيمات Chitinases الحالة لجدران خلايا الفطور الممرضة للنبات إضافة إلى عدة مركبات متطايرة مثبطة لنو الفطور مثل مركب 1,6-Octadiene,3-7-dimethyl.

تأثير المركبات العضوية المتطايرة التي تنتجها البكتيريا الخيطية في نمو الفطر *R. solani*

أظهرت النتائج قدرة عزلات البكتيريا الخيطية على إنتاج مركبات عضوية متطايرة أثرت في نمو الفطر *R. solani*. وقد سجلت عزلات البكتيريا *B. celere* و44 Actinomycetes أعلى نسبة مئوية للتثبيط في نمو الفطر *R. solani* بلغت 81.8 و81.5%، على التوالي، في حين تراوحت النسبة المئوية للتثبيط في نمو الفطر الممرض ماقيمته بين 18–53% في العزلات الأخرى (جدول 3). تتفق نتائج هذه التجربة مع عدة دراسات سابقة أشارت إلى قابلية البكتيريا الخيطية على إنتاج مركبات عضوية متطايرة مثل مركب Dimethyl Sulfoxide و Iso cyclocitral تثبط نمو الفطور الممرضة للنبات (Danael *et al.*, 2014) وقد تنتشر هذه المواد خلال جزيئات التربة وتثبط نمو الممرض (Janaki, 2016). كما ذكر Cho *et al.* (2017) أن المركبات المتطايرة المنتجة من البكتيريا الخيطية تعمل على تعطيل عمل الغشاء الداخلي للخلايا الفطرية كما تؤثر في أغشية العضيات كالمايتوكوندريا وغيرها.

جدول 1. الرقم التسلسلي للعزلات ونسبة مطابقتها مع العزلات القياسية ومصادر عزلها.

Table 1. Accession number of isolates, their compatibility with standard isolates, and their sources

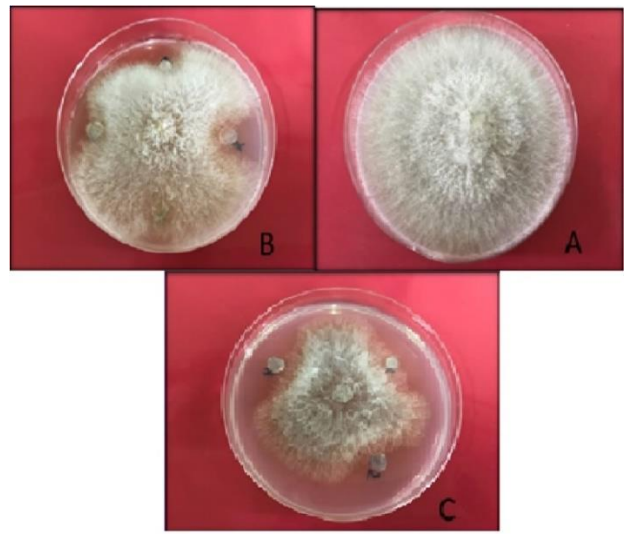
.

رقم بنك الجينات GenBank Accession No.	نسبة المطابقة (%) Compatibility (%)	الدرجة Degree	نسبة التعريف (%) % of identification	العزلة المطابقة Compatible isolate	رمز العزلة Isolate code	رقم العزلة Isolate No.	مصدر العزلة Source of isolate
LC501385.1	99	1814	99	*Streptomyces griseus* NBRC14886AB184627.1	LKA1	6	تربة soil
LC501386.1	99	1428	93	*Brevibacterium celere* DQ164K4147446.1	LKA2	66	جذور النخيل Date palm roots

جدول 2. القدرة التضادية لبعض عزلات البكتيريا الخيطية ضد الفطر الممرض *Rhizoctonia solani*.

Table 2. The antagonistic ability of some isolates of Actinomycetes against the pathogenic fungus *Rhizoctonia solani.*

عزلات البكتيريا الخيطية Actinomycetes isolates	معدل قطر منطقة التثبيط (مم) Inhibition zone (mm)
الشاهد Control	0.0
Streptomyces griseus	7
Actinomycetes 14	9
Actinomycetes 24	9
Actinomycetes 44	17
Brevibacterium celere	15
$LSD_{0.01}$	0.44



شكل 2. القدرة التضادية لبعض عزلات البكتيريا الخيطية ضد الفطر *Rhizoctonia solani*. (A) معاملة الشاهد *R. solani* فقط، (B) عزلات البكتيريا الخيطية المعزولة من التربة، (C) عزلات البكتيريا الخيطية المعزولة من النخيل.

Figure 2. The antagonistic ability of some isolates of Actinomycetes against *Rhizoctonia solani*. (A) control treatment, (B) Actinomycetes isolates isolated from soil, (C) Actinomycetes isolates isolated from date palms.

تأثير بعض عزلات البكتيريا الخيطية في خفض الإصابة بمرض موت بادرات الخيار المتسبب عن الفطر *R. solani*

أظهرت النتائج أن النسبة المئوية لإنبات بذور الخيار بلغت في معاملة الفطر الممرض 70% قياساً مع 90% في معاملة الشاهد (تربة غير ملوثة) (جدول 4). ورغم أن الفارق في النسبة المئوية للبذور لم يكن كبيراً بين معاملة الفطر الممرض ومعاملة الشاهد، إلا أن البادرات في معاملة التربة الملوثة بالفطر *R. solani* كانت متقزمة وضعيفة وقد يعود ذلك إلى حدوث تقرحات في الشعيرات الجذرية وهو مايفسر ارتفاع شدة الإصابة في معاملة الشاهد قياساً مع المعاملات الاخرى التي حسبت على أساس عدد الشعيرات الجذرية المتقرحة (شكل 3)، كما أظهرت النتائج (جدول 4) أن إضافة عزلات البكتيريا الخيطية حسنت من النسبة المئوية للانبات وبعض مؤشرات النمو، إذ بلغت النسبة المئوية لانبات البذور في معاملة العزلة *B. celere* والعزلة Actinomycetes 24 المعزولة من التربة 93.3% في حين تراوحت النسبة المئوية للانبات بين 83.3 و90% في معاملات العزلات *S. griseus* وActinomycetes10 وActinomycetes 14 وActinomycetes 44.

جدول 3. تاثير المركبات المتطايرة التي تنتجها البكتيريا الخيطية في نمو الفطر *Rhizoctonia solani*.

Table 3. Effect of volatile compounds produced by Actinomycetes on the growth of *Rhizoctonia solani*.

المعاملة Treatment	نسبة التثبيط في نمو الفطر (%) Fungal growth inhibition (%)
S. griseus	68
Actin-10	18.1
Actin-14	53.0
Actin-24	36.5
Actin-44	81.5
B. celere	81.8
$LSD_{0.01}$	20.7

جدول 4. تأثير بعض عزلات البكتيريا الخيطية في اصابة نبات الخيار بالفطر *Rhizoctonia solani*.

Table 4. Effect of some Actinomycetes bacterial isolates in cucumber plants infection with *Rhizoctonia solani*.

المعاملة Treatment	نسبة الإنبات (%) Germination rate (%)	شدة الإصابة (%) Disease severity (%)	نسبة موت البادرات (%) Seedling damping-off (%)
شاهد 1 Control 1	90.0	0.0	0.0
شاهد 2 Control 2	70.0	80.8	11.4
S. griseus	90.0	21.7	4.7
Actin-10	83.0	17.7	1.0
Actin-14	90.0	19.0	1.0
Actin-24	93.3	24.4	1.0
Actin-44	90.0	16.9	5.2
B. celere	93.3	19.6	1.0
$LSD_{0.01}$	17.3	3.1	5.8

* شاهد 1= تربة معقمة غير مضاف لها أي عامل، شاهد 2= تربة معقمة مضاف لها الفطر الممرض فقط.

* Control 1= Sterile soil with no added factor, Control 2= Sterile soil with fungal pathogen only.

كما أظهرت النتائج إن أعلى نسبة مئوية لموت البادرات سجلت في معاملة الفطر *R. solani* والتي بلغت 11.37% إلا أن اضافة عزلات البكتيريا الخيطية قللت من التاثير السلبي للفطر الممرض وبفارق معنوي عن معاملة الشاهد (تربة ملوثة بالفطر الممرض *R. solani*)، إذ انخفضت النسبة المئوية لموت البادرات إلى 1% في معاملة البكتيريا Actinomycetes 10، Actinomycetes 14، Actinomycetes 24 و*B.celere* في حين بلغت 4.7 و5.2% في العزلتين *S. griseus* و44 Actinomycetes، على التوالي. كما أظهرت النتائج أن أقل نسبة مئوية لشدة الإصابة سجلت في معاملة Actinomycetes 10 اذ بلغت 17.1% مقارنة مع 80% في معاملة الشاهد (تربة ملوثة بالفطر الممرض)، في حين تراوحت النسبة المئوية لشدة الاصابة بين 16.9 و24.4% في معاملات البكتيريا الخيطية الاخرى، كما انعكس اضافة البكتيريا الخيطية إلى تربة الاصص بشكل ايجابي في مؤشرات النمو (شكل 4)، وفي محتوى النبات من العناصر الكبرى NPK مما يشير إلى تحسن صحة الجذور في هذه المعاملات (جدول 5).

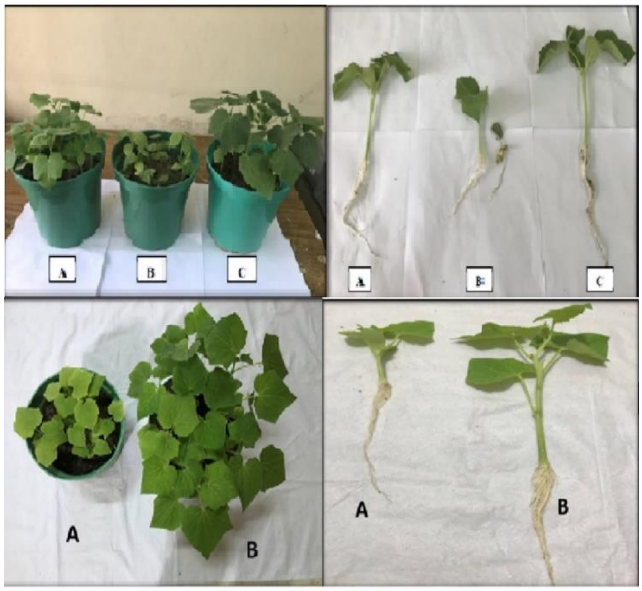
جدول 5. تأثير البكتيريا الخيطية في محتوى نباتات الخيار من العناصر الكبرى (NPK).

Table 5. Effect of Actinomycetes on cucumber plants macronutrients NPK content.

المعاملة Treatment	نتروجين (غ) N (g)	فوسفور (غ) P (g)	بوتاسيوم (غ) K (g)
شاهد Control	12.950	0.956	11.341
S. griseus	23.742	1.098	15.491
Actin-10	15.108	0.906	13.566
Actin-14	19.833	1.039	14.625
Actin-24	18.317	1.232	16.716
Actin-44	21.292	1.085	13.766
B. celere	20.533	1.087	15.716
$LSD_{0.05}$	10.535	0.396	7.76

يعد الفطر *R. solani* نوعاً معقداً يتكون من مجموعة من الأنواع المتشابه في صفاتها المظهرية، تقسم عادة إلى مجاميع تسمى Anastomosis groups اعتماداً على خاصية الالتحام بين الخيوط الفطرية. تختلف هذه المجموعات في خصائصها الإمراضية، فقد يسبب بعضها تعفن البذور بصورة أكبر من موت البادرات، في حين تسبب عزلات أخرى العكس. وتسبب مجموعات أخرى تقرحات في الجذور اكثر من تعفن البذور أو موت البادرات (الرديني، 2012؛ Agrios, 2005).

إن نتائج هذه التجربة فيما يخص دور البكتيريا الخيطية في خفض التاثير السلبي للفطر *R. solani* يتفق مع ماذكره Goudjal *et al.* (2014) الذي أشار إلى كفاءة 34 عزلة من Actinomycetes في خفض مرض موت بادرات الطماطم/البندورة. كما أشار Barrios-Gonzales *et al.* (2003) أن البكتيريا الخيطية تنتج عدة مركبات مضادة للفطور الممرضة للنبات. كما ذكر Couillerot *et al.* (2012) أن الجنس Streptomyces ينتج عدة مركبات مضادة للفطر *Botrytis cinerea*.



شكل 4. تأثير البكتيريا الخيطية في نمو بادرات الخيار وفي أصابتها بالفطر *R. solani*. **القسم العلوي**، (A) البادرات في تربة معقمة، (B) البادرات في تربة ملوثة بالفطر الممرض فقط، (C) البادرات في تربة معاملة بالبكتيريا الخيطية وملوثة بالفطر الممرض. **القسم السفلي**، (A) البادرات في تربة غير معاملة بالبكتيريا الخيطية، (B) البادرات في تربة معاملة بالبكتيريا الخيطية.

Figure 4. Effect of Actinomycetes on the growth of cucumber seedlings and their infection with *R. solani*. **Upper part:** (A) seedlings in sterilized soil, (B) seedlings in soil infested with the pathogenic fungus only, (C) seedlings in a soil treated with actinomycetes bacteria and pathogenic fungus. **Lower part:** (A) seedlings in soil not treated with actinomycetes bacteria, (B) seedling in soil treated with actinomycetes bacteria.

Abstract

Fayyadh, M.A. and L.K. Awad. 2021. Evaluation Efficiency of Different Isolate of Actinomycetes for Control of Cucumber Seedling Damping-off Disease Caused by *Rhizoctonia solani* (Khun). Arab Journal of Plant Protection, 39(4): 281-288. https://doi.org/10.22268/AJPP-39.4.281288

This study was conducted in Plant Protection Department, College of Agriculture, University of Basrah during the period 2017-2018 aimed to isolate and identify Actinomycetes from different environmental sources and evaluate their efficiency to control cucumber damping off disease caused by *Rhizoctonia solani*. 28 isolates of Actinomycetes were isolated from different sources from the Basrah region. All such isolates were gram positive, amylase and catalase positive and they had branched hyphae. Molecular identification following amplification of 16sRNA confirmed that Actinomycetes isolate No 6 isolated from soil had a similarity of 99% with *Streptomyces griseus*, whereas the isolate No 66 isolated from date palm roots had a similarity of 99% with *Brevibacterium celere*. The nucleotide sequence of the two isolates has been deposited at NCBI with Genbank accession number LC501385.1 for *S. griseus* and LC501386.1 for *B. celere*. The dual culture technique showed that Actinomycetes isolates *S. griseus* and *B. celere* had high antagonistic activity against *Rhizoctonia solani*, which produced inhibition zones of 7 and 15 mm in dimeter, respectively. On the other hand, volatile compounds released from *S. griseus* and *B. celere* inhibited the growth of *R. solani* by 68 and 81.5%, respectively. Pot experiment showed that all actinomycetes isolates significantly reduced cucumber seedling damping–off incidence caused by *R. solani*.

Keywords: Actinomycetes, *Rhizoctonia solani, Cucumber, Biological Control*

Affiliation of authors: *M.A. Fayyadh* and L.K. Awad, Plant protection Department, College of Agriculture, University of Basrah, Iraq. *Email of corresponding author: muamer2010@yahoo.com*

References

Abdulhamed, Z.T. 2013. The isolation and study of morphological characterization of Streptomyces the soil as a source of active antibiotic. College of Basic Education Research Journal, 12(3): 745-75.

Abussaud, M.J., L. Alanagreh and K. Abu-Elteen. 2013. Isolation, characterization and antimicrobial activity of *Streptomyces* strains from hot spring areas in the northern part of Jordan. African Journal of Biotechnology, 12(51): 7124-7132. https://doi.org/10.5897/AJBO9.1489

Aghigh, S., G.H. Shahidibonjar, R. Rawashdeh, S. Batayneh and I. Saadoun. 2004. First report of antifungal spectra of activity of Iranian Actinomycetes strain against *Alternaria solani, alternaria alternate, fusarium solani, Phytophthora megasperma, Verticillium dahlia* and *saccharomyces cervisiae*, Asian Journal of Plant Sciences, 3(4): 463-471. https://doi.org/10.3923/ajps.2004.463.471

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th Edition. Elsevier Academic Press, USA. 998 pp.

Amin, D.H., S. Tolba, A. Abolmatty, N.A. Abdallah and E.M.H. Wellington. 2017. Phylogenetic and antimicrobial characteristics of a novel *Streptomyces* sp. RU 87 isolated from Egyptian soil. International

رمضان، نديم أحمد وفرح خالد الفيل. 2013. عزل أكتينوميسيتات التربة المنتجة للمضادات الحيوية للفطريات الممرضة للنبات. مجلة الرافدين، 41(4): 286-295.

*[**Ramadan, N.A. and F.K. Al Feal.** 2013. Isolation of Actinomycetes producing antibiotics for plant pathogenic fungi, Journal of Al Rafadian, 41(4): 286-295. (In Arabic).]*

طواجن، أحمد محمد مرسي. 1975. بيئة البيوت الزجاجية. مطبعة جامعة البصرة. 573 صفحة.

*[**Tawajen, A.M.M.** 1975. Greenhouse Environment. Basra University Press. 573 pp. (In Arabic).]*

المراجع

أيليا، سهى سلمان. 2008. عزل وتشخيص النوع *Streptomyces lavendulae* من التربة ودراسة الظروف المثلى لأنتاج المضادات الحيوية. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق، 87 صفحة.

*[**Elia, S.S.** 2008. Isolation and identification of Streptomyces lavendulae from soil and study of optimal conditions for antibiotic production. M. Sc. thesis, College of Education, University of Mosul, Iraq. 87 pp. (In Arabic).]*

الرديني، علاء محمد رشا عبد الامير. 2012. مقارنة عزلات مختلفة من الفطر *Rhizoctonia solani* Kuhn باستخدام تقنات الوراثة الجزيئية وبعض المعايير المظهرية والفسلجية. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق. 124 صفحة.

*[**Al-Rudainy, A.M.R.** 2015. A comparison of different isolates of Rhizoctonia solani kuhn using molecular genetic techniques and some morphological and Physiological criteria, MSc thesis, College of Agriculture, University of Basrah, Iraq, 124 pp. (In Arabic).]*

الرفاعي، فيصل عبد الرحمن محمد. 2004. المكافحة المتكاملة لمرض موت بادرات الطماطة *Lycopersicon esculentum* المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة البصرة. 186 صفحة.

*[**Al-Rifaei, F.R.M.** 2004. Integrated control of tomato seedling damping-off caused by Rhizoctonia solani, MSc thesis, College of Agriculture, University of Basrah, Iraq. 85 pp. (In Arabic).]*

الوائلي، ضياء سالم علي. 2004. دراسة عن مرض موت بادرات الطماطة ومكافحتها المتكاملة في مزارع الزبير وسفوان.أطروحة دكتوراه. كلية العلوم. جامعة البصرة. 110 صفحات.

*[**Al-Waily, D.S.A.** 2004. A study on the damping –off disease of tomato and its integrated control in the farms of Zubayer and Safwan, PhD thesis, College of Science, University of Basrah, Iraq. 110 pp. (In Arabic).]*

Igbinosa, E.O., A.E. Igelige, I.H. Igbinosa, A. Beshiru, E.E. Odjadjare, F.O. Ekheise and A.I. Okoh. 2017. Isolation and characterization of antibacterial metabolites produced by *Streptomyces* species from Escravos river, Nigeria. Tropical Journal of Natural Products Research, 1: 22-23. https://doi.org/10.26538/TJNPR/V111.5

Inderiati, S. and C.M.M. Franco. 2008. Isolation and identification of endophytic Actinomycetes and their antifungal activity. Journal of Biotechnology Research in Tropical Regions, 1: 1-6.

Janaki, T. 2016. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* by *Streptomyces cacaoi subsp cacaoi*. World Journal of Pharmacy and pharmaceutical Science, 5: 1516-1527. https://doi.org/10.20959/wjpps20168-7457

Kamal, R. and A.K. Sharma. 2014. Control of Fusarium wilt using biological agent *Streptomyces spp* Cpp-53 isolated from compost with plant growth promoting effect on tomato under greenhouse conditions,Journal of Microbiology and Antimicrobials, 6: 97-103. https://doi.org/10.5897/JMA2014.0318

Prescott, L., J.P. Harley and D.A. Klein. 2005. Microbiology, 6th edition. McGraw-Hill Company, USA. 992 pp.

Salah, Y. and M. Khalil. 1991. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces* spp. to soft rot bacteria in soil. Egyptian Journal of Microbiology, 26: 171-182.

Shrivastava, P., R. Kumar and M.S. Yandigeri. 2017. In vitro biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureotaciens* K20: A potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) goid, Saudi Journal of Biological Science, 24(1): 192-199. https://doi.org/10.1016j.sjbs.2015.12.004

Sowndharajan, K. and S.C. Kang. 2012. In vitro antagonistic potential of *Streptomyces* sp. AM-S1 against plant and human pathogens, Journal of Agricultural Chemistry and Environment, 1(1): 41-47. https://doi.org/10.4236/jacen.2012.11007

Journal of Current Microbiology and Applied Science,6(8): 2524-2541. https://doi.org/10.3390/antibiotics.10101264

Barrios-Gonzalez, J., F.J. Fernandez and A. Tomasini. 2003. Microbial secondary metabolites production and strain improvement. Indian Journal of Biotechnology, 2(3): 322-333.

Cho, G., J. Kim, C.G. Park, C. Nislow, D.M. Weller and Y.S. Kwak. 2017. Caryolan-1-01, an antifungal volatile produced by *Streptomyces spp*. inhibits the endomembrane system of fungi. Open Biology, 7:1-9. https://doi.org/10.1098/rsob.170075

Couillerot, O., P. Vasta, S. Loqman, Y. Ouhdouch, H. Jane, J.-H. Renault, C. Clément and E.A. Barka. 2012. Biocontrol and biofertilizer activities of the *Streptomyces anulants* S37: an endophytic actinomycetes with biocontrol and plant-growth promoting activities. Conference: Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens, IOBC-WPRS Bulletin 86: 271-276.

Danael, M., A. Baghizadeh, S. Pourseyedi, J. Amini and M. Yaghoobi. 2014. Biological control of plant fungal diseases using volatile substances of *Streptomyces griseus*. European Journal of Experimental Biology, 4(1): 334-339.

Espinosa, L.E., A.L.D. Baines and K.L. Lowe. 2013. Biochemical, nutrient and inhibitory characteristics of Streptomyces cultured from a hyper saline estuary, the Laguna Madre (Texas), Journal of Biological Science, 13(1): 18-27. https://doi.org/10.3844/ojbsci.2013.18.27

Goudjal, Y., O. Toumatia, A. Yekkour, N. Sabaou, F. Matieu and A. Zitouni. 2014. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophyte Actinomycetes isolated from native plant of Algerian Sahara. Microbiological Research, 169: 59-65. https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.014

Received: September 21, 2020; Accepted: October 23, 2021

تاريخ الاستلام: 2020/9/21؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2021/10/23