African Journal of Advanced Pure and Applied Sciences (AJAPAS)
Online ISSN: 2957-644X
Volume 2, Issue 1, January-March 2023, Page No: 165-177
Website: *https://aaasjournals.com/index.php/ajapas/index*
||Arab Impact factor 2022: 0.87|| sjifactor 2022: 4.308 || ISI 2022: 0.557

عزل وتشخيص بعض الفطريات والبكتيريا المتواجدة داخل جذور (أندوفيت) نبات القمح الطري *Triticum aestivuml* وتأثيرها على إنبات بذور الشعير الأسود

Isolation and identification of some fungi and bacteria present in the roots (endophyte) of soft wheat plant Triticum aestivuml and their effect on germination of black barley seeds (Taridah)

نجاة إدريس عمر*
أستاذ مساعد، مركز البحوث الزراعية الحيوانية، البيضاء، ليبيا

Najat Idris Omar*
Assistant Professor, Animal Agricultural Research Center, Al-Bayda, Libya

*Corresponding author: *njatalbrsy88@gmail.com*

Received: January 24, 2023	*Accepted: March 03, 2023*	*Published: March 09, 2023*

الملخص

تم عزل بعض الفطريات وبعض من البكتيريا الخيطية من جذور نبات القمح الطري من عينات تم جلبها أجري عليها عمليات العزل عليها وتنميتها على بيئة بطاطس دكستروز آجار (PDA) وبيئة الاجار المغذي (NA)وتم تشخيصها مورفولوجياً وشكل نمو مستعمراتها كما، تم دراسة نشاط بعض الإنزيمات منها إنزيم الأميلاز ، إنزيم البروتيز و إنزيم الليبيز والستريز لهذه الكائنات الدقيقة الداخلية(فطريات وبكتيريا). وتم تعزيز نمو بادرات نبات الشعير الأسود (تاريدة) من طرف هذه العزلات حيث تم اختبار إنبات البذور وبينت النتائج أنه من بين 8عزلات 5 من العزلات فطرية و3 من العزلات بكتيرية والتي كان لها تأثير على نمو البادرات لنبات الشعير حيث وجد أن البكتيريا الخيطية جنس *Streptomyces* أكثر فعالية لنمو الجذور والسويقة لنبات الشعير حيث انه من الممكن أن تكون مصدر للمركبات النشطة بيولوجياً ويمكن أنه يعمل على تعزيز نمو النباتات الأخرى والتي تتطلب منا دراسة أوسع وأكثر تعمقاً لمعرفة الدور الذي تلعبه العديد من الكائنات الحية الدقيقة المتواجدة في جذور العديد من النباتات

الكلمات المفتاحية: الفطريات، شعير التاريدة، البكتيريا الخيطية *Streptpmyces*، القمح الطري*Triticum aestivuml*

Abstract

Some fungi and some filamentous bacteria were isolated from the roots of the soft wheat plant from samples that had been isolated and grown on potato dextrose agar (PDA) and nutrient agar (NA). They were diagnosed morphologically and the growth form of their colonies and the activity of some enzymes was studied. Amylase enzyme Protease, lipase enzyme, and esterase for these internal microorganisms (fungi and bacteria). The growth of the seedlings of the black barley plant (Taridah) was enhanced by these isolates, where the seed germination was tested, and the results showed that among the 8 isolates, 5 are fungal isolates and 3 are bacterial isolates, which had an effect on the seedling growth of the barley plant, as it was found that the filamentous bacteria of the genus Streptomyces is more Effective for root and stem growthof the barley plant, as it can be a source of biologically active compounds and can promote the growth of other plants, which requires us to study more extensively and in-depth to know the role played by many microorganisms present in the roots of manyplants.

Keywords: Fungi, Tarida Barley, Streptpmyces, Soft Wheat Triticum aestivuml

المقدمة

تعد النجيليات Gramineae من المحاصيل الاقتصادية في العالم فبلغ الانتاج العالمي من القمح حوالي 661 مليون طن خلال عام 2012-2013 (منظمة الأغذية والزراعة ،2013). كما يعد محصول الشعير من المحاصيل القديمة وهو من المحاصيل التي تعد مصدراً أساسيا لتصنيع الأعلاف وأفضل بديل في الزراعات البعلية ويعد أكثر أهمية بعد محصول القمح نتيجة ارتباطه الوثيق بقطاع الثروة الحيوانية ومن جهة أخرى توجد العديد من المشاكل التي تهدد الأمن والانتاج الغذائي المستدام (Haggag, 2010). من بين الطرق المتبعة في مكافحة الأمراض النباتية المكافحة الكيميائية التي تعتمد على استعمال الأسمدة ، مبيدات فطرية ومبيدات حشيرية ومبيدات الأعشاب الضارة، هذه المواد غالباً ما تشكل خطراً على البيئة وصحة الانسان زيادة على ذلك الاستعمال المنحصر ، التكلفة العالية ومحدودية الفعالية (Muhammad et al., 2011) العديد من المشاكل البيئة دفعت بالباحثين إلى البحث عن مصادر أخرى لمركبات جديدة نشطة بيولوجياً تكون أكثر فعالية وأقل سمية وأقل ضرر على البيئة .لسنوات مضت ضلت الأبحاث منصبة على الأحياء الدقيقة التي تعيش في التربة من أجل الحصول على مركبات جديدة إلا أنه على ما يبدو أن عددها بدأ يتناقص في الفترة الأخيرة الأمر الذي استلزم البحث عن مواطن جديدة تسكنها الأحياء الدقيقة . واحد من بين هذه المصادر هي الكائنات التي تسكن الأنسجة النباتية والتي من الممكن أن تكون مصدر للمركبات النشطة بيولوجياً ذات الاستعمال المفيد في الزراعة، الطب والصناعة (Tejesvi et al.,2007). أن الأحياء الدقيقة الداخلية للنبات (Endophytes) هي الكتئنات الدقيقة التي تعيش داخل أو بين أنسجة النباتات الحية الراقية من دون أن تسبب لها في أعراض مرضية، هذه الأخيرة تلعب دور هام في صحة النباتات التي تسكنها من خلال تعزيز نموها والمقاومة لمختلف ظروف الإجهاد والحماية ضد الكائنات الدقيقة الممرضة والحشرات من جهة أخرى أثبت إنها مصدر للمركبات هام للمركبات الجديدة النشطة بيولوجياً حيث أنها قادرة على إنتاج مجموعة واسعة من المستقلبات الثانوية التي يمكن أن تكون لها نشاط المضادات الحيوية ، مضادات الطفيليات ،مضادات الأكسدة، مضادات للسرطان واستعمالات واسعة في المجال الزراعي(Hasegawa et al., 2006; GVao et al., 2010) وفي هذا السياق ولغرض البحث عن عزلات جديدة تكون مصدر للمركبات النشطة بيولوجياً اتجهنا إلى دراسة الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية لنبات القمح الطري وبعض النشاطات البيولوجية لها وذلك من خلال

-عزل الفطريات والبكتيريا الخيطية الداخلية من جذور وسيقان القمح الطري وانتقاء العزلات التي لها نشاط ضد ميكروبات عن طريق اختبار أولي

-التعرف على العزلات التي أظهرت نشاط مضاد للميكروبات من الاختبار الأولي.

- دراسة تأثير هذه العزلات على نمو نبات الشعير الاسود.

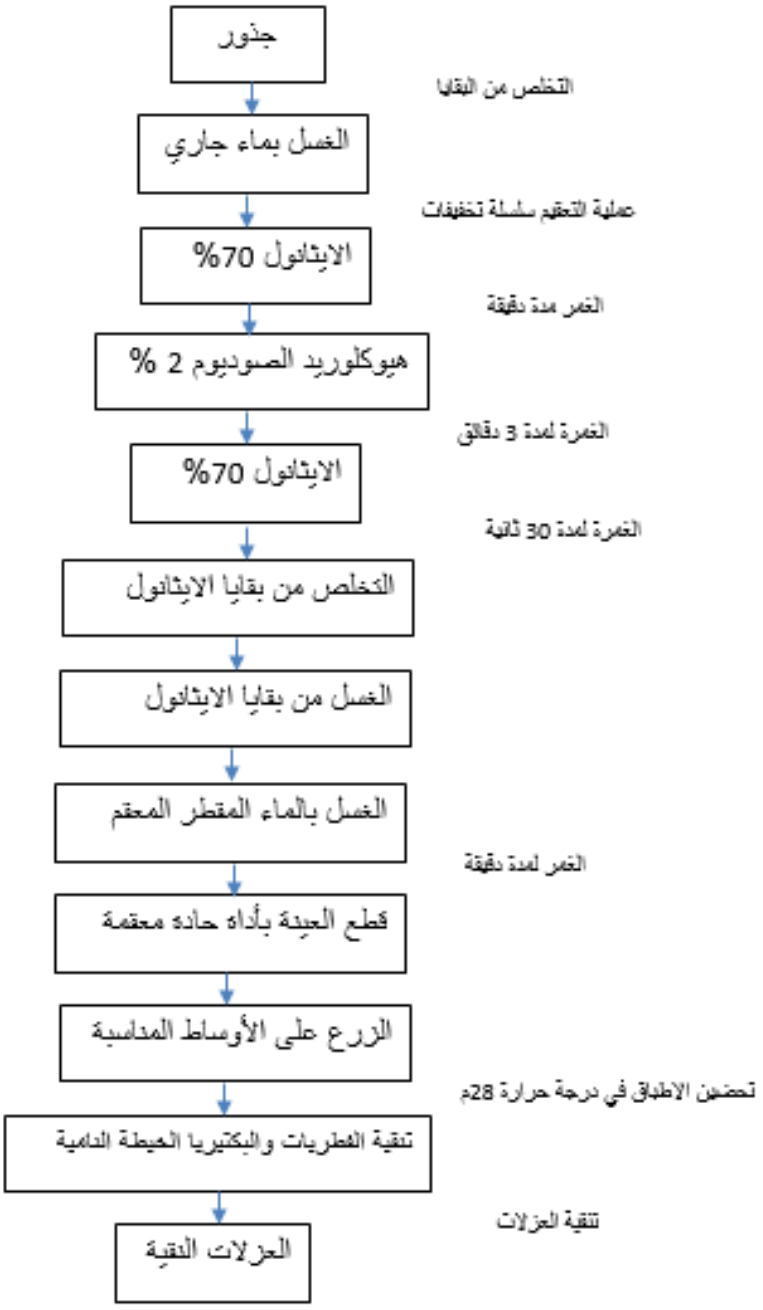
المواد وطرق البحث

تم جمع نباتات القمح بجذورها وبعشوائية من ثلاث حقول من منطقة الجبل الأخضر.

عزل الفطريات والبكتيريا الخيطية الداخلية لجذور القمح

عرضت العينات النباتية لعملية الغسل المستمر تحت ماء الجاري بهدف نزع البقايا العالقة بها ثم عرضت لعلية تعقيم السطح الثلاثي المتعاقب بهدف القضاء على الكائنات الحية التي تعيش على السطح ثم قطعت إلى أجزاء صغيرة وتغمر تسلسلياً في كحول الأيثانول 75% لمدة دقيقة واحدة ثم في هيبو كلوريد الصوديوم 2% لمدة 3 دقائق ثم الأيثانول 75% لمدة دقيقة أخيراً غسلت بالماء المقطر المعقم مرتين وبعد هذه المرحلة تقطع العينات بأداة حادة ومعقمة إلى قطع صغيرة (5مل*5مل) وتركت تجف على ورق ترشيح معقم ونزع ثلاث قطع من كل عينة بثلاث مكررات لكل منها في أطباق بتري الحاوية على وسط Potato Dextros Agar(PDA) وبيئة NA بهدف عزل كل من الفطريات والبكتيريا ثم حضنت الأطباق على درجة حرارة 28مْ وتم مراقبة الأطباق يومياً بعد علملية التحضين وتتم اقتطاع جزء من الطرف النامي للعزلات و أعيد زرعها على وسط PDA بهدف تنقية كل نمو (Larran et al., 2007;ZIN et al.,2007) وتم الإعتماد

للتحقق من فعالية عملية التعقيم السطحي في هذه الدراسة على طريقتين (Naik et al.,2009; Verma et al.,2009) أخذ في الطريقة الأولى 0.5 مل من الماء المطر المعقم المتحصل عليه في آخر عملية الغسل ونشر على كل من أطباق PSA . SCA
ويتم الإعتماد للتحقق من فعالية عملية تعقيم السطح في هذه الدراسة على طريقتين وفقاً Naik et al.,2009; Verma et al .,2009) أخذ في الطريقة الأولى 0.5 مل من الماء المقطر المعقم المتحصل عليه في آخر عملية الغسل ونشر على كل من أطباق بطاطس سكروز أجار PSA وبيئة نشا سكروز اجار SCA أما في الطريقة الثانية فيتم أخذ بعض القطع المعقمة وتمسح على أوساط العزل المذكورة ،وتحضن الأطباق على درجة حرارة 28مْ وتراقب يومياً غياب أي نمو ميكروبي يدل على فعالية طريقة تعقيم سطح العينات كما تم حساب معدلات الاستيطان ومعدلات العزل (Yuan et al, 2010).



شكل (1): مخطط يوضح تعقيم سطح ساق النبات لعزل وتنقية الفطريات والبكتيريا الداخلية حسب (Larran et al., 2007).

تشخيص الفطريات والبكتيريا المعزولة

أ- **تشخيص الفطريات المعزولة:** يتم التعرف على أجناس الفطريات المزولة بلإعتماد على الخصائص المورفولوجية باستعمال أوساط مختلفة PDAوبيئة مستخلص الشعير أجار MEA والخصائص المجهرية باستعمال المجهر الضوئي إذ تم الإستعانة في تحديد الأجناس الفطرية بمفاتيح التشخص لكل من (Pitt J.I and Hocking 1985;Botton et al., 1990; Champion., 1997)

معدل النمو سريع بطئ أو معتدل

لون المستعمرات و التغيرات الحاصل في اللون توزيع منتظم للون أوة متذبذب

لون خلفية المستعمرة

إفراز الصباغ الملون لوسط الزرع

بنية سطح المستعمرة : قطيفية أو قطنية ، حبيبية أو ملساء ، مسطحة أو مرتفعة على الوسط

وجود قطرات مائية (exsuda) على سطح الميسلسوم

خصائص الهيفات : اللون مقسمة أو غير مقسمة

انتاج الأجسام الثمرية (Fruiting bodies) Corenia, Perithecia, Sporoia, Pycnidia Sporodochia, .

لون وحجم وشكل الأجسام الثمرية.

ب- تشخيص البكتيريا الخيطية المعزولة

تم التعرف على البكتيريا الخيطية على مستوى الجنس بالإستعانة بمفاتيح التشخيص (Breed et al 1957; Holt et al, 1924) وذلك بالإعتماد على الخصائص المورفولوجية المزرعة وبعض الخصائص البيوكيميائية بالإضافة إلى الخصائص المجهرية (Verma et al 2009) حيث تم تحديد الصفات التالية

- وجود ولون الميسلسوم مقسم أو غير مقسم
- شكل الجراثيم ولونها على الوسط Yeast Extract Malt بعد 21 يوم من التحضين في درجة حرارة 27مْ
- مورفولوجية وترتيب السلاسل الجرثومية: طويلة قسيرة سلاسل في شكل خيط، لولبية أو حلزونية
- بنية سطح المستعمرة: - جيلاتينية، حبيبية أو غبارية.
- تلوين بصبغة جرام

دراسة نشاط الأنزيمات الفطرية

أنزيم الأميلاز

أختبر نشاط أنزيم الأمليز لدى الفطريات بوضع أقاص الاجار الفطرية يقطر(5ملم) على الوسط Glucose yeast extract peptone agar(GYP) مضاف إليه 2% من النشا المعدل وحضنت على درجة حرارة 25مْ لمدة ثلاثة أيام وبعد التحضين غمرت الأطباق بمحلول كاشف (IKI) المتكون من 1% من iodine و2% من potassium Iodine فالهالة المحيطة بالمستعمرة الفطرية تعتبر نتيجة موجبة نشاط إنزيم الأميلازوباقي الوسط يظهر باللون الأزرق (Maria *et al*., 2005).

أنزيم البوتيز

تم الاختبار باستعمال وسط GYP مضاف إليه 0.4% من الجيلاتين 8% والذي يعقم لوحده ثم يضاف إلى الوسط GYP المعقم، بعد عملية التحضين تغمر الأطباق بالمحلول المائي المشبع Ammonium sulfat الذي يترسب مع الجيلاتين، حيث تظهر منطقة الجيلاتين المحلل هالة شفافة حول المستعمرة الفطرية دلالة على وجود نشاط إنزيم البروتياز أما المنطقة الغير محللة فيترسب مع محلول Ammonium Sulfate (Maria et al., 2005).

الليبيز والإستيرايز

عن طريق تنمية العزلات على الوسط Peptone Agar مضاف إليه Tween 80 كمصدر وحيد للكربون والذي يعقم بمعزل عن الوسط Peptone Agarويضاف بنسبة 1مل لكل 100 مل من الوسط، وحضن لمدة 5 أيام فظور هالة حول المستعمرة الفطرية بشكل ترسبات بلورية دليل على إيجابية ونشاط إنزيم الأستريز (Carrim et al., 2006).

دراسة نشاط الإنزيمات البكتيرية

إنزيم الأميلاز

تم زرع البكتيريا الخيطية على الوسط (YMA) يحتوي على 2% من النشاء القابل للذوبان (المعدل) وحضنت الأطباق لمدة 24 ساعة على درجة حرارة 28 مْ لمدة 5 أيام ثم تم معاملتها بمحلول (IKI) المتكون من 1% من iodine و2% من potassium Iodine ظهور هالة شفافة حول المستعمرة البكتيرية يدل علة نشاط إنزيم الأميلاز(Faucher et al., 1995).

إنزيم البروتيز

ولدراسة نشاط إنزيم البروتيز تم استعمال الوسط YMA يحتوي على 5% (وزن/حجم) من مسحوق الحليب خالي الدسم أو منزوع الدهون (Skimed Milk) والمعقم لوحدة حيث زرعت معلق الجراثيم بعد كشط المستعمرات بالماء المقطر المعقم وبواسطة ابره معقمة ثم تحضن على درجة حرارة 28 لمدة 6أيام ثم تم معاملة الأطباق بمحلول HCL بتركيز 0.1 ويعد ظهور هالة شفافة حول المستعمرة البكتيرية دليل على وجود نشاط إنزيم البروتيز (Faucher et al., 1995).

إنزيم الليباز والإستريز

لمعرفة نشاط إنزيم الليباز والإستريز تم إضافة 1% من Tween 20 و Tween 80 بعد تعقيمهم كل منهما لوحده إلى الوسط Peptone Agar، ثم زرع المعلق الجرثومي على الوسط ثم حضنت في درجة حرارة 28مْ لمدة 7 أيام وجود هالة ذات ترسبات بلورية دليل على وجود نشاط إنزيم الليباز والإستريز (Carrim et al., 2006; Sousa et al., 2008).

دراسة تأثير الفطريات والبكتيريا الداخلية على أنبات ونمو بذور الشعير صنف تاريدة الأسود

- معالجة بذور الشعير الأسود شكل (2) بالفطريات والبكتيريا المعزولة بهدف دراسة تأثير هذه الأحياء الدقيقة على أنتاش ونمو بذور الشعير بالاعتماد على الطريقة المتبعة من طرف (Mukhtar). حيث في أول مراحل التجربة تم تحضير المعلقات الفطرية البكتيرية والبكتيرية بتنمية كل منها على الوسط MEA في درجة حرارة 30مْ حتى درجة التجرثم الجيد بعدها تغمر بالماء المقطر المعقم وتكشط الجراثيم بلطف بواسطة ملعقة معقمة وتجمع الجراثيم وتسترجع في أنابيب اختبار ويثبت تركيزها عند 18 جرثومة/مل ويضاف لها 2% وزن حجم من النشا الذي يستعمل كملزج لتسهيل عملية تثبيت الجراثيم على سطح البذور السليمة التي لا توجد علي سطحها صدوع أو تشققات بعد عملية تعقيمها سطحياً بغمرها 15 دقيقة في محلول هيبو كلوريد الصوديوم 1% وتغسل ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم بعدها تم غمر البذور في المعلق المحضر كل على حده مدة 1-3 دقائق كما استعمل شاهدين الأول بذور مغمورة في معلق النشا والثاني مغمور في ماء مقطر معقم وتركت حتى جففت البذور وتزرع بمعدل 5 بذور في أطباق بتري بها أوراق ترشيح مشبع بالماء المقطر المعقم مع أخذ الاعتبار 5 مكررات لكل معاملة ثم حضنت الأطباق في درجة حرارة 25 مْ ظلام لمدة أسبوع وتراقب يومياً عدد البذور المنتشية.
- تأثير الفطريات والبكتيريا الخيطية على انبات ونمو بذور الشعير في آخر مرحلة التحضين تم حساب نسبة الإنبات حسب (Mukhtar .2008) وفقاً للعلاقة التالية كما تم حساب الوزن الطري لكل من السويقات والجذور الناتجة وحساب معدلات طول السويقات والجذور الناتجة

وحساب معدلات طول السويقات والجذور بهدف حساب مؤشر قوة نمو البادرات Vigor Index(VI) (Taskin et al.2008) وفقاً للمعادلة

$$VI=(PL+RL)\times GP$$

VI: Vigor Index مؤشر نمو البادرات
PL: Plumule length طول السويقات النامية
RL: Roots Length طول الجذور
GP: Germination percentage نسبة الإنبات

النتائج والمناقشة

تشخيص الفطريات والبكتيريا الخيطية المعزولة: -

بعد دراسة الخصائص المورفولوجية (المجهرية) شكل (2و 3) لكل من الفطريات النشطة تم الحصول على النتائج التالية جدول (1)وكما تم وبالاعتماد على الخصائص المزرعية والبيوكيميائية للعزلات البكتيرية الخيطية تم الحصول على النتائج في جدول (2) فمن خلال النتائج تبين أن كل العزلات الثلاثة تظهر بعد 2-3 أيام من التحضين شمعية بعد 14 يوم من التحضين مستعمراتن ذات الأوان مختلفة (أبيض رمادي أو رمادي مخضر) مع شكل الميسيلوم الهوائي وبعد 21 يوم تغير لون الميسيلوم إلى اللون النهائي (بني بني فاتح إلى فاتح مخضر) بالنسبة للصبغة المنتشرة لم تسجل إلا عند العزلة الثانية لكن بدرجة قليلة وتبين من خلال الفحص بالمجهر كل العزلات لها ميسيلوم غير مجزأ وميسيلوم هوائي وكلاهما غزير التفرع لكن بدرجة أقل العزلة الثانية مع وجود سلاسل حاملة للجراثيم وتكون حلزونية ومتوسطة الطول لدى عزلة أما عزلة كانت متوسطة الطول من جهه أخرى كل العزلات موجبة للتلوين بصبغة جرام والكتاليز وهوائية غير متحركة ،كل من الخصائص المورفولوجية والمجهرية لكل العزلات الفطرية التي أظهرت أنه يحل 5 فطريات منها *Penicillum-Alterenaria Sp- Aspergillus* وفطر ينتمي إلى *Ascomycetec* وهو *Chaetamium sp* على هذا الأساس تم اعتبار العزلات الثلاثة تنتمي إلى جنس Streptomyces sp. والأجناس الفطرية والبكتيرية المتحصل عليها هي أجناس داخلية شائعة العزل من العديد من النباتات (Marquez et al.,2007) إذ تم عزل كل من الأجناس *Alterenaria. Aspergillus* من القمح الطري *Triticum aestivuml* . *Penicllium. Phoma*. من طرف (Arifuzzaman *et al* ., 2010) كما تم عزل البكتيريا الخيطية من القمح الطري (Conn et Franco,2004) فتبين من عزل هذه الفطريات والبكتيريا الخيطية من الأنسجة السليمة لنبات القمح يوحي أن العائل قد يستمد بعض الفوائد من الفطريات والبكتيريا الخيطية التي يأويها لها دور في تعزيز نمو النبات (Coombs et Franco, 2003).

دراسة تأثير الفطريات والبكتيريا الداخلية على انبات ونمو بذور الشعير الأسود

من مقارنة تأثير مختلف العزلات الفطرية والبكتيرية الداخلية المعزولة على نمو الشعير الأسود وذلك بالاعتماد على إنبات البذور وعلى طول ووزن السويقات تبين أن معظم العزلات لم يكن لها تأثير إيجابي على نمو نبات الشعير الأسود ماعدا العزلتين الداخلية المعزولة على نمو الشعير وذلك بالاعتماد على إنبات البذور وعلى طول ووزن السويقات تبين أن معظم العزلات لم يكن لها تأثير إيجابي على نمو نبات الشعير الأسود ماعدا العزلتين 1 *Streptomyces* و 2*Steptomyces* الذي بالمشاهدة والمقارنة تبين أن هناك فرق كما هو موضح في جدول (4) وهذا ما أشار إليه حسون (2014) أن نباتات الباميا المعاملة ببكتيريا سلالة *Bacillus subtillis* تزداد مقاومة لفطر *Rhizoctonia solanoi* في تحسين معايير النمو والإنتاجية في ظروف الإصابة بفيروس موزاييك الخيار وهذا يتفق مع ما أشار له راضي (2017) إلى أن بعض الكائنات الحية لها تأثير محفز في مقاومة جذور نبات الباميا ضد المسبب المرضي لعفن الجذور والساق المتسبب عن الفطر .*Fusarium solani* كما ويتفق مع ما توصل إليه عمر ومحمد (2022) من أن الكائنات لها تأثير في تحسين النمو في إنبات القمح الطري.

جدول (1):الخصائص المورفولوجية للفطريات النشطة التي تم الحصول

العزلات	الخصائص	
	الخصائص المورفولوجية للمستعمرة	الخصائص المجهرية
العزلة الأولى	نمو سريع قطنية ذات ألوان ابيض في البداية وتحول إلى اللون البني على بيئة PDA	الهيفا مقسمة إنتاج اجسام ثمرية Perithicia وبعد 10 أيام كبيرة الحجم سوداء محاطة بهيفات سميكة سوداء بها فتحة تتحرر منها أكياس جرثوية حاوية على جراثيم كيسية دائرية الشكل
العزلة الثانية	نموها سريع على بيئة PDA بيضاء إلى رمادية ذات حواف فاتحة صوفية وخضراء زيتية	الهيفا مقسمة ذات حامل كونيدي مقسمة بني تكون لكونيديا بنية اللون كمثرية الشكل ومقسمة طولياً وعرضياً في شكل سلاسل منفردة
العزلة الثالثة	نموها سريع بيضاء ذات حواف قطنية إلى غبارية	الهيفا مقسمة شفافة ينشأ منها حامل جرثومي غير متفرع ينتهي بانتفاخ كروي محاط كلياً يحمل عليها اجسام قارورية الشكل
عزلة الرابعة	النمو متوسط بنية فاتحة في المركز بيضاء الحواف مع وجود ميسليوم ابيض	الهيفاء مقسمة بنية زيتية قليلة التفرع واكونيديا يتم إنتاجها في شكل سلاسل متفرعة طرفية
العزلة الخامسة	نموها سريع مسطحة ناعمة رمادية إلى زيتية اللون	الهيفا مقسمة سمراء مخضرة ،إنتاج الجسم الثمري Pycnidia كبيرة الحجم دائرية سوداء بها فتحة تطرح عبرها الكونيديا اسطوانية الشكل، مشكلة للكلاميدوسبورا

جدول (2): الخصائص المزرعية لعزلات البكتيريا الخيطية على بيئة الأجار المغذي

العزلات	وسط NA الأجار المغذي		
	مظهر المستعمرة	ميسيلوم هوائي	مادة الميسيلوم
العزلة الأولى	غبارية	أبيض+اخضر	مصفر
العزلة الثانية	غبارية	ابيض إلى رمادي	بني فاتح
العزلة الثالثة	غباري	بني مخضر	بني مخضر

جدول (3): يوضح الخصائص المرفلوجية للعزلات

الخصائص	العزلات		
	العزلة الأولى	العزلة الثانية	العزلة الثالثة
مادة الميسيليوم	غير مقسم	غير مقسم	غير مقسم
طبيعة السلاسل	حلزونية	حلزونية طويلة	لولبية متوسطة الطول
إنتاج أصباغ	+	-	-
صبغة جرام	+	+	+
الكتاليز	+	+	+
الحركة	ساكنة	ساكنة	ساكنة
نمط التنفس	هوائية	هوائية	هوائية

دراسة نشاط الإنزيمات لمختلف العينات المزولة

تم عن طريق الزرع على الأوساط والتي تحتوي على مادة تفاعل كل إنزيم وبعد حساب قوة نشاط الإنزيمات (نسبة الإنتاج الإنزيمي = قطر المستعمرة والهالة المحيطة بها) تبين أنه يوجد فرق معنوي عند ($P<0.05$) بين العزلات في إنتاج مختلف الإنزيمات مقارنة بالعزلات الآخرى في حين البعض لم تبدي اختلاف كبير جدول(4) حيث تبين أن نشاط إنزيم الأميلاز قادرة علي انتاجه جميع العزلات مع تشابه كبير بين الفطريات في إنتاج هذا الإنزيم بينما العزلات جنس .streptomyces sp تميزت بنشاط أكبر، إذ سجل أكبر قيمة عند العزلة streptomyces sp.1 (5.2) عند استعمال النشا القابل للذوبان . أما عن نشاط إنزيم البروتيز باستعمال الجيلاتين تم اختبارها على الفطريات حيث وجد أن أغلب العزل قادرة على إنتاج الجيلاتينيز مع تسجيل أكبر قيمة للمؤشر الإنزيمي (1.8) من طرف العزلة .Penicillium sp، وبالنسبة لعزلات streptomyces sp كانت كل العزلات نشطة وسجلت العزلة .streptomyces sp3 أعلى نتيجة (4.3). أما عن نشاط إنزيم الليباز والاستريز فتم تسجيل أن العزلة streptomyces sp1 (4) وأغلب العزلات تمتلك أنزيم الأستريز وبنشاط أكبر عند العزلة 1. streptomyces sp (2.2). وبالتالي فإذا كان المؤشر الإنزيمي أكبرمن 1 فإن الكائنات المختبرة تعد منتجة للإنزيم الخارج خلوي المختبر وبالتالي فإن طريقة الزرع على سطح الآجار من بين الطرق الهادفة إلى معرفة النشاط الإنزيمي وهو وسيلة سهلة وسريعة لاختبار والمقارنة بين النشاطية الإنزيمية لعدد أكبر من الكائنات من الكائنات الحية الدقيقة (Alves *et al*., 2002; Carrim *et al*., 2006).

جدول (4): مقارنة متوسطات النشاط الإنزيمي للفطريات والبكتيريا المعزولة.

العزلات	النشاط الإنزيمي			
	Esterase(T80)	**Lipase(T20)**	**Amylase**	**Protease**
Alternaria sp.	0	0	1.2^{d}	1.3
Aspergillus sp.	0	0	1.5^{d}	1.1d
Phoma sp.	0	0	1.4^{d}	1.4^{d}
Penicilium sp.1	0	1.2^{d}	2.2^{b}	2.1^{a}
Penicilium sp.2	0	0	1.5^{d}	1.2^{d}
Streptomyces sp.1	2.4^{a}	3.8^{a}	5.2^{a}	2.0^{b}
Streptomyces sp.2	2.0^{b}	2.6^{b}	4.2^{b}	$2.8a^{b}$
Streptomyces sp.3	1.5^{c}	2.1^{c}	4.0^{c}	4.3^{a}

دراسة تأثير الفطريات والبكتيريا الداخلية على إنبات بذورالشعير الأسود

وتم ذلك بالأعتماد على إنبات البذور وعلى طول ووزن السويقات حيث تبين أن معظم العزلات لم يكن لها تأثير إيجابي على نمو نبات الشعير الأسود ماعدا عزلات *Streptomyces sp* التي أظهرت العزلات الثلاثة وجود فرق معنوي ($P<0.05$) مقارنة بالشاهد (1,2) الجدول (5) يبين أن كل عزلات *Streptomyces sp* كان له تأثير إيجابي على نمو نبات القمح مقارنة بالشاهد حيث تبين أن *Streptomyces sp* لها القدرة من رفع الكتلة الحيوية لكل من السويقات والجذور الناشئة كما إنها ترفع من مؤشر قوة نمو البادرات والذي يعبر عنه من خلال تأثيرها على كل من نسبة الإنبات وطول السويقات والجذور الناشئة حيث كان أكبر موشر لعزلة *Streptomyces sp(1)* ثم يليها نسبة البكتيريا *Streptomyces sp(2)* (642.22، 528.28) يعزى ذلك أن البكتيريا الداخلية الخيطية تعزز نمو النباتات حيث يمكن أن تحفز نمو النباتات بطريقة غير مباشرة مثل انتاج بعض المستقلبات ذات النشاط البيولوجي ضد الفطريات الممرضة للنباتات أو بطريقة انتاج الهرمونات المعدلة لنموها (Auxins, Gibberellin, Cytokinins, Ethylene and Abscisic acid)والتي تعمل على تحفيز نمو النباتات في مختلف مراحل النمو(Qin *et al* 2011)

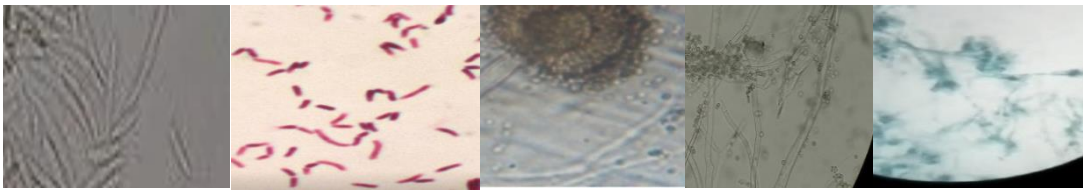
جدول (5): يوضح تأثير الفطريات والبكتيريا المعزولة على نمو وإنبات الشعير الأسود

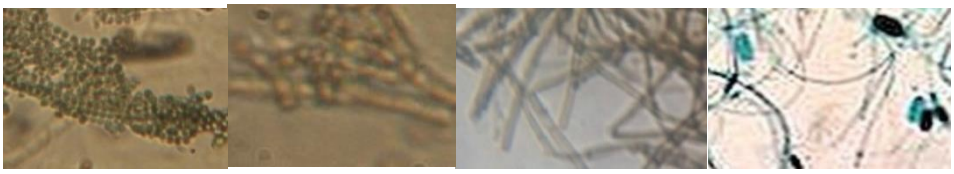
المعاملة	مؤشر نمو البادرات	النمو(%)	طول الجذر cm	طول السويقةc m	وزن الجذر mg	وزن السويقة mg
الشاهد (1) ماء مقطر معقم	277.95	60.99	4.5	3.55	16.5	15.65
الشاهد (2) النشا	254.22	62.02	4.04	3.65	15.54	16.49
Penicllium sp1	176.72	45.00	3.83	4.37	17.22	17.80
Penicllium sp1	158,67	45.00	3.44	3.87	16.76	17.67
Alternaria	235.1	59.79	4.01	5.34	16.50	17.00
Phoma sp	205.77	50.53	4.00	3.65	17.65	17.45
Aspergillus sp.	223.05	56.00	3.90	4.65	16.98	16.83
Streptomyces(1`)	642.22	92.32	6.87	7.98	26.00	35.22
Streptomyces(2)	528.11	77.65	6.70	7.86	22.33	34.32
Streptomyces(3)	441.5	65.33	6.64	7.70	22.33	30.12

مما سبق في دراستنا يتبين لنا عن أهمية البكتيريا الخيطية *Streptomyces* من حيث تزويد النباتات بمصادر غذائية من بينها النيتروجين كما يمكن اعتبارها مصدر لبعض الهرمونات والعناصر الغذائية المعززة لنمو نبات الشعير وكما يمكن أن تكون معزز لنمو العديد من النباتات الأخرى والتي تتطلب المزيد من الدراسة الميدانية وإمكانية استعمالها في العديد من الزراعات.

شكل (1): يبين شكل شعير تاريده الأسود

شكل (2): الفطريات والبكتيريا التي تم عزلها من جذور نبات القمح الطري





شكل (3): جراثيم الفطريات والميسيليوم والبكتيريا مجهرياً.

المراجع

1-حسون، ابراهيم خليل، كاظم زغير خضير وكفاح هادي راضي.2014 تأثير البكتيريا Bacillus thuringiensis، Bacillus subtilis و pseudomonas في المقاومة الحيوية لنبات البامية من الإصابة بفطر *Rhizoctonia solanoi*. مجلة الفرات للعلوم الزراعية، 5: 464-484.

2-راضي، كفاح هادي. 2017. المكافحة الأحيائية للفطر Fusarium solani مسبب مرض تعفن جذور الباميا. أطروحة دكتوراه،قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق. 167 صفحة.

3-عمر، نجاة إدريس و محمد، أمال عاشور(2022). عزل وتشخيص بعض الكائنات الحية الدقيقة داخل جذور نبات القمح الطري *Triticum aestivuml* وتأثيرها على إنبات بذور القمح. مجلة الباحث العدد (35).

4-Alva P., Mckenzie E.H.C., Pointing S.B., Pena-Muralla R. and Hyde K.D. Do sea grasses harbor endophytes? Fungal Diversity 2002; 7: 167-178.

5-Arifuzzaman M., Khatun M. R. and Rahma H. Isolation and screening of actinomycetes from sundarbans soil for antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology* 2010 ; **9**: 4615-5619.

6-Botton B. Breton A., Fevre M., Guy P.H., Iarpent J.P., Sanglier J.J., Vayssier V. andVeau,P. Moisissures utiles et nuisibles.Importance Industrielle.Masson 1990. Pp. 20-191.

7-Breed R.s.; Murray E.G.D and Smith N.R. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 7 th ed Williams & Wilkins, Baltiuore 1957; pp. 694-826.

8-Carrim A. J. I., arbosa E. C. and Gonçalves J. D. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of Jacaranda decurrences Cham. (Carobinha-do-campo). Brazilian Archives of Biology and Technology 2006; 49: 353-395.

9-Champion R. Identifier Les champignons transmis par Les semences. *INRA* edition 1997. P. 401

10-Conn V.M and Franco C.M. Analysis of the endophtic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum L.*) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones.*Appl Environ Microbiol*2004; **70**: 1787-1794.

11-Coombs J. T. and Franco C. M. Isolation and Identification of Actinobacteria from Surface-Sterilized Wheat Roots. *Applid And Environmental Microbiology* 2003a; **69**: 5603-5608.

12- Coombs J. T. and Franco C. M. Visualization of an endophytic Streptomyces species in wheat seed. *Appl Environ Microbiol* 2003b; **69**: 4260-4262.

13-Faucher E., Paradis E., Goyer C., Hodge N.C., Hougue R., Stall R. E. and Beaulieu C. Characterization of streptomycetes causing deep-pitted scab of potato in québec, canada. International Journal of Systematic Bacteriology 1995; 45: 222-225.

14-Hasegawa S., Meguro A., Shimizu M., Nishimura T. and Kunoh H. Endophytic actinomycetes and fheir interactions with host plants. *Actinomycetologica* 2006; **20:** 72-81.

15-Holt J.G.; Krieg N.R.; Sneath P.H.A.; Staley J.T. and Williams S.T. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 9 th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore 1994; pp. 605-619

16-Larran S., Perello A. and Simon M. R. the endophytic Fungi From wheat (Triticumaestivum L.). *World J Microbiol Biotechnol* 2007; **23**: 565-572.

17-Maria G.L., Sridhan K.S. and Raviraja N.S. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. Journal of Agricultural Technology 2005; 1:67-80.

18-Marquez S. s., Bills G. F. and Zabalgogeazcoa I. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata. Fungal Diversity* 2007; **27**: 171-195.

19-Moon C. D., Guillaumin J. J., Ravel C., Li C., Craven K. D. and Schardl C. L. New neotyphodium endophyte species from the grass tribes stipeae and meliceae. *Mycologia* 2007; **99**: 895-905.

20-Mukhtar I. Influence of *Trichoderma* species on seed germination in okra . *Mycopath* 2008; **6**: 47-50.

21-pitt J. I. and Hocking A. D. Fungi and Food spoilage. *Academic press Inc*. Sydney. Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Montreal, Tokyo 1985. Pp. 414.

22-Qin S., Xing K., Jiang J. H., XuL. H.and Li W. J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; **89:** 457-473.

23-Sousa C. D. S., Soars A. C. F. and Garrido M. D. S. Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. Sci Agric 2008; 65: 50-55.

24-Taskin E., Eltem R., Silva E. S. D. and Souza J. V. B. D. Screening of Aspergillus strains isolated from vineyards for pectinase production. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 2008; **6**: 412-414.

25-Tejesvi M. V., Kini K. R., Prakash H. S., Subbiad V. and Shetty H. S. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Diversity* 2007; **24:** 37-54.

26-Verma V. C., Gond S. K. Kumar A., Mishra A., Kharwar R. N. and Gange A. C. Endophytic actinomycetes From Azadirachia indica A. Juss.: isolation, diversity,and anti-microbal activity. *Microb Ecol* 2009; **57:** 749-756.

27-Yuan Z. L., Zhang C. l., Lin F. c. and Kubicek C. P. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (Oryza granulate) from a nature reserve in Yunnan, China. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 1642-1652.

الملاحق

Potato Sucrose Agar

Potatoes	200g	-
Sucrose	20g	-
Agar	20g	-
Distille water	1000mL	-

Starch Casein Agar(SCA)

Sooluble starch	10g	-
Casien	0.3g	-
KNO_3	2g	-
NaCL	2g	-
K_2HPO_4	2g	-
$MgSO4.7H_2o$	0.05g	-
$CaCO_3$	0.02	-
$FeSO_4.7H_2O$	0.01g	-
Agar	18g	-
Distille water	1000mL	-

Potato Dextrose Agar(PDA)

Potatoes	200g	-
Glucose	10g	-
Agar	18g	-
Distille water	1000mL	-

Yeast Extract-Malt Extract Agar (YMA)

Yeast extract	3g	-
Malt extract	3g	-
Peptone	5g	-
Glucose	10g	-
Agar	15g	-
Distille water	1000mL	-

Malt Extract Agar(MEA)

Malt extract	20g	-
Peptone	1g	-
Glucose	20g	-
Agar	20g	-
Distille water	1000mL	-

Nutrient agar(NA)

Pepton	10g	-
Yeast extract	5g	-
NaCl	5g	-
Distille wat	1000mL	-
Agar	18g	-