Title of Thesis: Effect of Microbial Interaction of Soybean Rhizosphere On Pathogenic Sclerotial Forming Fungi .

Supervisors: Prof.Dr. Kamel K. Sabet ; Prof.Dr.: Mohsen A. Mostafa and Dr. Soad El-Shenawy

Department: Plant Pathology

Branch: Plant Pathology

Approval: 30 / 9 / 2004

ABSTRACT

Fungal genera those called sclerotia forming fungi were the most dominant fungi isolated from naturally damped-off and root-rotted three varieteis of soybean plants, i.e. Crowford;Giza21 and Giza111 collected from four governorates, i.e. Giza; Beni Sweif; Kafr El-Sheikh and Gharbiya . These fungi were identified as *R. solani* ; *S. bataticola* and *S. rolfsii* . One isolate of *R. solani* ; *S. bataticola* and *S. rolfsii* was high virulent towards the variety Giza21 . Two isolates of *B. subtilis* ; one isolate of *T. harzianum* and three isolates of actinomyces were isolated from the rhizosphere of soybean plants grown in four governorates through different growth stages. The previous rhizospheric microorganisms in additior to the Baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and *Bradyrhizobium japonicum* had antagonistic potential towards the three pathogenic fungi . All the selected biocontrol agents had the ability to produce chitinase enzyme when grown on crab shell and mycelial cell wall of any plant parthogenic fungi as a single carbon source, *Bradyrhizobium japonicum* was the most producers one compared with *Streptomyces* sp. (isolate No.3)was the lowest one. Also, application of biocontrol agents as soil treatment was more active than seed treatment for controlling the infection by the three pathogenic fungi . Visable increasing in (total, free as well as conjugated phenols); (total soluble, reducing and non-reducing soulble sugars) and total free amino acids in case of the infection with the three pathogenic fungi under hydroponic culture conditions, however the combination among three pathogens and eight biocontrol agents caused a noticeable decrease in total free amino acids. Also, the combination among three pathogens and eight biocontrol agents caused higher contents of cystine, cysteine and methonine, however the infection caused absence of the three thio amino acids. Using rice grain shells as a carrier for biocontrol agents increased the antagonistic potential of biocontrol agents towards the three pathogens . Application of soybean-wheat-soybean (S-W-S) rotation system decreased the soybean root-rot and increased the antagonistic potential of eight biocontrol agents espicially *Bradyrhizobium japonicum*. Also, adding *Bradyrhizobium japonicum* with other biocontrol agents increased the antagonistic activity of biocontrol agents and decreased root-rot disease incidence of soybean plants.

أسـم الطالب : عبيـر هاشم عبد الخالق محمود **الدرجة :** الدكتوراه
عنـوان الرسـالة : تـأثير التفاعل بين ميكروبـات الريزوسفير لنباتـات فول الصـويا علـي الفطريـات الممرضة المكونة للأجسام الحجرية .
المشرفون : أ.د./ كامل كمال ثابت ، ا.د./ محسن أحمد مصطفي ، د./ سعاد الشناوى
قسم : أمراض النباتات
فرع: أمراض النباتات **تاريخ منح الدرجة :** ٣٠/ ٩/ ٢٠٠٤

المستـخلص

تعتبر الفطريات المكونة للأجسام الحجرية من أغلب الفطريات التي تم عزلها من ثلاث أصناف من فول الصويا (كراو فورد – جيزة٢١ – جيزة١١١) مصابة أصابة طبيعية بسقوط البادرات و أعفان الجذور من أربع محافظات مختلفة هم (الجيزة – بني سويف – كفر الشيخ – الغربية). عرفت هذه الفطريات علي أنها ريزوكتونيا سولاني – سكليروشيم باتاتيكولا – سكليروشيم رولفزياي. و قد لوحظ بالدراسة أن عزلة واحدة من كل فطر من الفطريات السابقة لها قدرة مرضية عالية تجاة الصنف جيزة ٢١. تم عزل ٢ عزلة من البكتريا باسيلس ساتلس و عزلة من الفطر ترايكودرما هارزيانم و ثلاث عزلات من الأكتينوميسيتات من ريزوسفير نباتات فول الصويا من أربع محافظات مختلفة خلال مراحل مختلفة من نمو النبات. لوحظ بالدراسة أن كائنات الريزوسفير السابقة العزل بالأضافة الى خميرة الخباز (سكاروميسس سرفيسيا) و براديريزوبيوم جابونيكم لها قدرة تضادية أتجاة الفطريات الممرضة. من ناحية أخرى لوحظ أن كل العوامل الحيوية المنتقاه لها قدرة على انتاج انزيم الكيتينيز وذلك عندما نميت على بيئات كان مصدر الكربون فيها اما قشور الجمبرى أو جدر خلايا الفطريات الممرضة سالفة الذكر ، كما وجد من الدراسة أيضا أن البكتيريا براديريزوبيوم جابونيكم كانت أكثر قدرة على انتاج انزيم الكيتينيز مقارنة بعزلة ستربتوميسس(رقم٣) حيث كانت أقل الكائنات المضادة انتاجا للأنزيم . وجد أيضا أن اضافة العوامل الحيوية الى التربة زودت من كفاءة هذه العوامل فى مقاومة الفطريات مقارنة بمعاملة البذوربالعوامل . أيضا وجد أن الأصابة بالفطريات الممرضة تحت ظروف المزارع المائية أدت الى زيادة ملحوظة فى الفينولات الكلية و الحرة والمرتبطة وكذلك السكريات الذائبة الكلية والختزلة و الغير مختزلة و أيضا الأحماض الأمينية الكلية الحرة . كذلك تواجد المسببات الممرضة مع ٨ عوامل حيوية مجتمعة أدى الى زيادة محتوى الحماض الأمينية الكبريتية (السستين – السستيين – الميثونين) مقارنة بالأصابة التى أدت الى غياب هذه الأحماض الأمينية وجد بالدراسة أيضا أن أستخدام قشور حبوب الأرز كمادة حاملة للعوامل الحيوية أدى الى زيادة القدرة التضادية للعوامل الحيوية اتجاه المسببات المرضية . كذلك لوحظ أن اتباع نظام تعاقب المحاصيل (فول صويا – قمح – فول صويا) ادي الي خفض اصابة فول الصويا باعفان الجذور عن طريق زيادة القدرة التضادية لـ ٨ عوامل حيوية خاصة براديريزوبيوم جابونيكم • ايضا اضافة براديريزوبيوم جابونيكم مع العوامل الحيوية الاخري ادي الي زيادة القدرة التضادية للعوامل الحيوية الاخري وخفض نسبة اصابة محصول فول الصويا باعفان الجذور •

CONTENTS

Page

INTRODUCTION..... 1

REVIEW OF LITERATURE..... 3

MATERIALS AND METHODS..... 21

EXPERIMENTAL RESULTS..... 44

1- Isolation of the causal microorganisms of damping-off and Root-rot diseases of soybean plants 44

2- Pathogenicity test 46

3- Isolation of the rhizospheric microorganisms of soybean plants 49

3-1-Fungi isolated from rhizosphere of soybean plants grown in four governorates and their frequencies. 49

3-2- Total count of colony forming units (cfu) of bacteria isolated from rhizosphere of soybean plants grown in four governorates at different growth stages..... 56

3-3- Total count of colony forming units (cfu) of Actinomyces isolated from rhizosphere of soybean plants grown in four governorates at different growth stages. 59

4- Detection and estimation of antagonistic potential of rhizospheric fungi , bacteria and actinomycetes. 62

4-1- Estimation of antagonistic potential of rhizospheric fungi (*Trichoderma* spp. isolates). 62

4-1-a- Effect of *T. harzianum* parasitism on sclerotial germination percentage of *r. solani* , *S. bataticola* and *S. rolfsii* at different incubation periods 66

4-2- Detection and estimation of antagonistic potential of rhizospheric bacteria 70

Page

4-3- Detection and estimation of antagonistic potential of rhizospheric *Streptomyces* spp. isolates 71

5- Differentiation between antagonistic potential of bacteria actinomyces , bradyrhizobium and yeast against the three tested pathogenic fungi , using culture filtrates 74

5-1- Effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* (two isolates)culture filtrate on the liner growth of three pathogenic fungi. 77

5-2- Effect of different concentrations of *Streptomyces* spp. (three isolates)culture filtrate on the liner growth of three pathogenic fungi. 77

5-3- Effect of different concentrations of *Bradyrhizobium japonicum* culture filtrate on the liner growth of three pathogenic fungi. 79

5-4- Effect of different concentrations of *Saccharomyces cerevisiae* culture filtrate on the liner growth of three pathogenic fungi. 81

5. 5. Effect of different concentrations of *Trichoderma harzianum* (three isolates)culture filtrate on the liner growth of three pathogenic fungi. 81

6- Production of chitinase enzyme by the tested biocontrol agents 83

7- Application of biocontrol microorganisms as seed and soil treatment for controlling the infection by the pathogenic fungi 85

8- Effect of interaction between the three tested pathogenic fungi and different biocontrol microorganisms on the root exudates contents of soybean plants grown under hydroponic culture conditions 92

8-1- Determination of phynolic compounds. 92

8-2- Determination of soluble sugars. 94

page

8-3- Determination of total free amino acids. 96

8-4- Determination of thio (sulphur) amino acids content. ... 98

9- Examination of different carriers for application of biocontrol microorganisms. 100

10- Effect of crop rotation system on the interaction between the pathogenic fungi and biocontrol microorganisms during growing season (2001 – 2002)..... 104

11- Synergestic effect of the microorganisms used in biocontrol and rhizobacteria (*Bradyrhizobium japonicum*) on the tested pathogenic fungi..... 106

DISCUSSION 110

SUMMARY..... 126

REFERENCES..... 131

ARABIC SUMMARY.....