تأثير البكتريا المحفزة للنمو (PGPR) في الحد من الإصابة بفيروس موزاييك الخيار وتحفيز المقاومة لدى نباتات البندورة

Effect of Rhizobacteria (PGPR) in Reducing Infection with *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) and Stimulating Resistace in Tomato Plants

م. رامز الشامي [1]　　أ.د. عماد اسماعيل [1]　　د. ياسر حماد [3-2]

Eng. Ramez M. Al Shami[1]　　Dr. Imad D. Ismail[1]　　Dr. Yaser Hammad[2-3]

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تشرين اللاذقية، سورية.

(1) Plant Protection Dept., Faculty of Agriculture, University of Tishreen, Lattakia, Syria.

(2)قسم علوم التربة والمياه، كلية الزراعة جامعة تشرين، اللاذقية ، سورية.

(2) Department of soil and water sciences, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.

(3) المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة / أكساد/سورية.

(3) The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry lands (ACSAD)/Syria.

Ramezalshami924@gemail.com　　Yaser.hammad@tishreen.edu.sy

الملخص

هدف البحث إلى دراسة تأثير ثلاثة أنواع من البكيتريا المحفزة لنمو النبات (*Bacillus megaterium*، *Frateuria aurantia*، *Azotobacter chroococcum*)، بتلقيح بذور أو شتول نباتات البندورة المزروعة بأصص في نفق بلاستيكي في محافظة طرطوس/ سورية عام 2016 في الحد من تأثير فيروس موزاييك الخيار، بتقدير الشدة الإمراضية للفيروس ومحتوى حمض الساليسليك ونشاط أنزيم البيروكسيداز ضمن النبات. أظهرت مقارنة النتائج تفوق التلقيح المفرد عند استخدام النوع *F. aurantia* بشكل معنوي على النوعين البكتيريين *B. megaterium* و *A. chroococcum* بالنسبة لتخفيض الشدة الإمراضية للفيروس ومحتوى حمض الساليسليك ونشاط أنزيم البيروكسيداز ضمن نباتات البندورة، وأظهرت المعاملة المختلطة للأنواع الثلاثة من البكتيريا (تلقيح بذور وتلقيح شتول) أقل شدة إمراضية للفيروس وأعلى زيادة في محتوى الأوراق من حمض الساليسليك ونشاط أنزيم البيروكسيداز وبفروق معنوية مقارنة بباقي المعاملات ومعاملتي الشاهد السليم والمُعدى. وتفوقت طريقة تلقيح الشتول معنوياً على طريقة تلقيح البذور بالبكتيريا. إن انخفاض الشدة الإمراضية وترافقها مع زيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز ومحتوى حمض الساليسليك يشير لقدرة بكتريا الدراسة على تحفيز آليات المقاومة الجهازية وتخفيض تأثير الفيروس في نباتات البندورة.

الكلمات المفتاحية : بكتريا محفزة لنمو النبات (PGPR)، فيروس موزاييك الخيار، البندورة، الشدة الإمراضية، حمض الساليسليك، أنزيم البيروكسيداز.

©2019 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved. **ISSN:2305 - 5243 ; AIF-177 (p.78 -88)**

Abstract

This experiment aimed to study the effect of three species of plant growth promoting rhizobacteria (*Frateuria aurantia, Bacillus megaterium and Azotobacter chroococcum*) inoculated on seeds or shoots of tomato plants, on disease severity, salicylic acid and peroxidase activity content and their ability to suppressed the effect of *Cucumber mosaic virus* (CMV) in a plastic tunnel in Tartus, Syria,in year 2016. Results showed, that treatment with single bacterium *F. aurantia* produced significant reduction in disease severity and higher salicylic acid and peroxidase activity content compared with B. *megaterium* or A. *chroococcum*, in the CMV-infected or healthy control. Mixed treatment with the three bacterial species gave the highest reduction in disease severity and increase in salicylic acid content and peroxidase activity in both CMV-infected and healthy tomato plants. On the other hand, the inoculated shoots method was significantly superior as compared with inoculated seeds method. Such increase in salicylic acid content and peroxidase activity suggest the potential ability of rhizobacteria to stimulate mechanisms of systemic resistance and reduce the effect of CMV infection on tomato plants.

Keywords: PGPR, CMV, Tomato, Disease severity, Salicylic acid, Peroxidase activity.

المقدمة

تشغل البندورة .*Lycopersicon esculentum* Mill موقعاً رئيساً بين محاصيل الخضار في سورية لقيمتها الغذائية والتصنيعية، إذ وصل عدد البيوت المحمية المزروعة بالبندورة نحو 68 ألف بيت عام 2014 (المجموعة الإحصائية الزراعية، 2014). سجل عالمياً إصابة البندورة بأكثر من 30 فيروساً، تتبع 16 عائلة مختلفة (Martelli و Quacquarelli، 1983)، ومنها فيروس موزاييك الخيار Cucumber mosaic virus(CMV)، الذي ينتمي لجنس Cucumovirus وعائلة Bromoviridae، والذي يصيب أكثر من 1000 نوع نباتي منها البندورة (Soleimani وزملاؤه، 2011). ينتقل الفيروس ميكانيكياً بالعصارة النباتية، كما ينتقل بوساطة بذور أجناس نباتية مختلفة من العائلة القرعية ونباتات التبغ، وينتقل بوساطة التطعيم ونبات الحامول (*Cuscuta* sp.) وحبوب الطلع، كما ينتقل من نبات إلى آخر بوساطة أكثر من 60 نوعاً حشرياً من فصيلة المن Aphidae بالطريقة غير المثابرة (Non Persistent Manner) (Francki، 1985؛ Brunt وزملاؤه ، 1996؛ Sutic وزملاؤه ، 1999). تظهر أعراض الموزاييك على الأوراق على شكل تبقع شديد بالتناوب بين الأخضر الخفيف والأخضر الغامق، ثم يظهر تقزم للنبات وتماوت في القمم النامية (Brunt وزملاؤه، 1996؛ Sutic وزملاؤه، 1999؛ Cerkauskas، 2004؛ Agrios، 2005). ويُعد فيروس موزاييك الخيار من الفيروسات الأكثر خطورة على البندورة، وقد سجل ظهوره في سورية على البندورة في المنطقة الوسطى والساحلية (خليل، 2007) والجنوبية (Kawas، 2006).

تضم البكتريا المحفزة لنمو النبات Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) مجموعةً متعددة من البكتريا الموجودة في منطقة رايزوسفير النبات، والتي تعمل على تحفيز نوعي وكمي لنموه، وتسهيل امتصاص النبات للمواد الموجودة في التربة (Saharan و Nehra، 2011؛ Singh، 2013؛ Abdel Ghany وزملاؤه، 2013). يظهر التحفيز غير المباشر لنمو النباتات من خلال قدرة هذه البكتريا على الحد من تأثير ممرضات النبات وذلك بالتضاد وإنتاج بعض المركبات، مثل حاملات أو مثبتات الحديد Siderophores، والأجسام المضادة وغاز السيانيد (Bouizgarne، 2013).

أكد Zehnder وزملاؤه (2000) وSivasakthi وزملاؤه (2015) أن معاملة النباتات بسلالات معينة من PGPR أدى إلى انخفاض في حدوث وتطور الإصابة بفيروس موزاييك الخيار، وحفزت المقاومة الجهازية للنباتات. كما أشار Van Loon (1997، 1998، 1999) أن حمض الساليسليك يحفز المقاومة الجهازية المكتسبة (SAR) داخل العديد من النباتات ضد الفيروسات النباتية بتنشيط بعض مورثات الدفاع في النبات منتجة بروتينات مرتبطة بالإمراضية PRs (Pathogen Releated Proteins)، وبالتالي مقاومة النبات للأمراض الفيروسية. وجد Chittoor وزملاؤه (1999) و Ebrahim وزملاؤه (2011) أن زيادة الأنزيمات النباتية ومنها إنزيم البيروكسيداز يمكن أن تترافق مباشرة بالقدرة المتزايدة على حماية الأنسجة جهازياً باللغننة عند مهاجمة النباتات بالممرضات النباتية.

هدف البحث: نظراً لأهمية محصول البندورة الغذائية والاقتصادية، إذ يعدَ مصدراً مهماً للدخل في سورية. وبسبب تعرض نباتات البندورة

للإصابة بفيروس موزاييك الخيار في الزراعات الحقلية والمحمية (خليل، 2007؛ Kawas، 2006)، ولأهمية بكتريا PGPR في تحفيز المقاومة الجهازية ضد فيروس موزاييك الخيار، لذا هدف البحث لدراسة تأثير بكتريا PGPR في الحد من تأثير فيروس موزاييك الخيار في نبات البندورة، بقياس الشدة الإمراضية للفيروس، وتقدير حمض الساليسيليك الحر، وأنزيم البيروكسيداز ضمن أنسجة نباتات البندورة، ودورهما في تحفيز المقاومة الجهازية للنبات.

مواد البحث و طرائقه

المادة النباتية ومكان تنفيذ البحث:

استُخدم في الدراسة هجين البندورة سويتي (Sweety F1) غير محدود النمو (نسبة الانبات 85 %، والنقاوة 99 %، المنشأ الصين، ومعاملة بالثيرام، وإنتاج عام 2013). نُفذ البحث في الساحل السوري في محافظة طرطوس داخل بيت بلاستيكي (Greenhouse)، في الفترة من شباط (فبراير) حتى أيار (مايو) في الموسم الزراعي 2016م.

العزلة الفيروسية والأنواع البكتيرية المستخدمة في الدراسة:

استُخدمت عزلة محلية من فيروس موزاييك الخيار معرفة مسبقاً من مخبر الأمراض الفيروسية في كلية الزراعة بجامعة تشرين (اللاذقية/ سورية).

تم تحضير اللقاح الفيروسي حسب طريقة Jeffries (1998). استخدم النوع *Azotobacter chroococcum* وهي بكتريا محلية مثبتة للآزوت الجوي معزولة من تربة مزروعة بنبات البندورة (حماد والشامي، 2017)، تم تنميتها على البيئة المتخصصة AshbysMannitol Agar M706 (Technical Data، 2011)، ضمن أطباق بتري وحضنت على درجة حرارة 28°م لمدة ثلاثة أيام، والنوع *Bacillus megaterium*، وهي بكتريا ميسرة للفوسفور معزولة من المستحضر التجاري BIOPHOS/GET-PHOS (حماد والشامي، 2017)، تمت تنميتها على البيئة المتخصصة بالبكتريا الميسرة للفوسفور Pikoviskayas Agar (Technical Data، 2011)، ضمن أطباق بتري، ثم حُضّنت الأطباق عند درجة حرارة 33°م لمدة ثلاثة أيام. والنوع *Frateuria aurantia*، وهي بكتريا ميسرة للبوتاس معزولة من المستحضر التجاري BIO -NPK/BHARPUR (حماد والشامي، 2017)، تمت تنميتها على البيئة المتخصصة بالبكتريا الميسرة للبوتاس Glocuse- Yeast extract – $CaCO_3$ (Lisdiyanti وزملاؤه، 2003)، ثم حضنت الأطباق عند درجة حرارة 28°م لمدة ثلاثة أيام.

حُضّر اللقاح البكتيري باستخدام بيئة غذائية سائلة Tryptic Soy Broth (TSB) في زجاجات خاصة بتنمية البكتريا/ BIOGEN سعة 2 ل/، تسمح بالتحريك وتأمين التهوية الملائمة للنمو، واستُخدمت وحدة تنمية لكل نوع من بكتريا الدراسة المستخدمة، ولقحت البيئة السائلة بالعزلات بعد تنشيطها، والحصول على مزارع حديثة، ثم وضعت على هزاز بسرعة 100 دورة بالدقيقة، وحضنت عند درجة حرارة 28 °م، لمدة 48 ساعة، وتم استخدام شريحة العد Bürker لتقدير كثافة البكتريا وضبطها في المعلق وفق التركيز المطلوب 910 خلية/مل.

تلقيح نباتات البندورة بالبكتريا والعدوى بفيروس موزاييك الخيار:

- التلقيح بالبكتريا:

أضيفت اللقاحات البكتيرية المحضرة من الأنواع المدروسة (معلقات بتركيز 910 خلية/مل) وفق المعاملات المدروسة بطريقتين، الأولى: تلقيح البذور (s)، إذ أضيف اللقاح البكتيري إلى البذور بنقعها لمدة 4 ساعات. ونقُعت بذور الشاهد بالماء المقطر، وزرعت في صوان، ونُقلت الشتول بعد 30 يوماً من الزراعة إلى الأكياس البلاستيكية ضمن البيت المحمي. والثانية: تلقيح الشتول (sh)، إذ أضيف اللقاح البكتيري بسقاية الشتول بعد نقلها إلى وسط الزراعة بمعدل 15 مل لكل نبات مزروع من المعلق البكتيري تركيزه 910 خلية/مل حسب كل معاملة، وأضيف 15 مل ماءً مقطراً للشاهد.

- تصميم البحث والتحليل الإحصائي:

استُخدمت تربة زراعية أضيف لها سماد عضوي متخمر بنسبة 4/1 حجماً، وغُطيت بشريحة من البلاستيك الشفاف سماكته 200 ميكرون للتعقيم الشمسي، عُبئت الخلطة الزراعية ضمن أكياس بلاستيكية أبعادها 30×40 سم سعتها 28 لتراً، ووزعت الأكياس حسب المعاملات والمكررات على 4 خطوط مزدوجة، ويبلغ البعد بين الخط المفرد والآخر وبين النبات والآخر 40 سم، وبين الخطين المزدوجين وبين المكرر والآخر 100 سم، وقدمت لنباتات التجربة العمليات الزراعية اللازمة كافة. اتبع في تصميم البحث التصميم العشوائي الكامل، إذ تضمن 16 معاملة بأربعة مكررات لكل معاملة و3 نباتات لكل مكرر. بلغ عدد النباتات الكلي 192 نباتاً. حُللت النتائج إحصائياً باستخدام برنامج Genstat-12 إصدار 2009، واختبار One-way ANOVA (no Bloking)، ومقارنة الفروق بين المتوسطات عند مستوى معنوية 5 %.

القراءات (المؤشرات):

1. **الشدة الإمراضية** (DS) Disease severity:

تم حسابها من المعادلة التالية:

$$\text{الشدة الإمراضية (DS)} = \frac{\sum (\text{درجة المرض * عدد النباتات المصابة في كل درجة})}{\text{عدد النباتات الكلي * أعلى درجة للمرض}} * 100$$

قُدرت درجات المرض باستخدام السلم التالي (Murphy وزملاؤه، 2003):

0: لا توجد أعراض، 2: أعراض موزاييك معتدل على الأوراق، 4: أعراض موزاييك شديد على الأوراق، 6: موزاييك وتشوه أوراق، 8: موزاييك وتشوه شديد في الأوراق، 10: موزاييك وتشوه أوراق شديد وتقزم.

تم القياس بعد 14 و28 يوماً من أحداث العدوى الاصطناعية بالفيروس لكل المعاملات المدروسة.

2. **تقدير حمض الساليسيليك في أوراق البندورة:**

تم قياس تركيز حمض الساليسليك في أنسجة النبات وفق طريقة Maria وزملائه (2007) بعد أسبوعين من إجراء العدوى الاصطناعية بفيروس موزاييك الخيار، وذلك بوزن 1 غ من أوراق القمة النامية لنباتات التجربة، ووضعت ضمن جفنة بورسلان، وأضيف لها 1 مل من حمض كلور الماء 6 نظامي، و10 مل من الكلوروفورم، ثم طُحنت العينة بشكل جيد، ورشحت باستخدام قمع الفصل في أنبوب الاختبار، وأضيف لكل عينة 5 مل من محلول كلور الحديد $FeCl_3$ (تم تحضير محلول كلور الحديد بإضافة 0.5 غ بودرة كلور الحديد إلى 100 مل ماء مقطر، وحُرك جيدا لتمام الذوبان)، ويتكون نتيجة التفاعل بين حمض الساليسليك وشاردة الحديد الثلاثية Fe^{3+} معقد بنفسجي يختلف لونه باختلاف تركيز حمض الساليسيليك في العينة النباتية المختبرة، تم قراءة تركيز حمض الساليسيليك (ppm) والامتصاصية الضوئية للمحلول الناتج باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند موجة طولها 540 نانومتر، وذلك بعد رسم خط بياني باستخدام أربعة تراكيز من حمض الساليسيليك العياري 25 و 50 و 75 و 100 ppm والتركيز 0 ماء مقطر فقط.

3. **تقدير نشاط أنزيم البيروكسيداز:**

قُدر نشاط أنزيم البيروكسيداز حسب طريقة Hammerschmidt وزملائه (1982)، بأخذ 1 غ من كل أوراق نباتات التجربة بعد 14 و28 يوماً من العدوى الاصطناعية بفيروس موزاييك الخيار، وأضيف لها 3 مل من محلول فوسفاتي منظم Phosphate buffer (pH= 7) تركيز 0.1 مولاري عند درجة حرارة 4°م، ووضعت ضمن جفنة بورسلان وطُحنت بالهاون، ثم وضع الناتج ضمن أنبوب سعته 1.5 مل، ثم ثفلت لمدة 10 دقائق على سرعة 15000 دورة/دقيقة، وتم استخدام المادة الطافية مصدراً للأنزيم. تم قياس نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد إضافة 1.5 مل بيروغالول (Pyrogallol) 5 مولاري، و0.5 مل من 1 % ماء أوكسجيني، و0.5 مل من المستخلص الإنزيمي، حضن مزيج التفاعل عند درجة حرارة 28°م. تم القياس عند طول موجة 420 نانومتر، وأخذت القراءة كل 30 ثانية لمدة 3 دقائق. قدر نشاط أنزيم البيروكسيداز بعدد ميكرومولات الماء الأوكسجيني التي تتفكك بوساطة 100 مغ من النسيج النباتي الداخل في تشكيل المستخلص الإنزيمي في الدقيقة الواحدة عند درجة حرارة 25°م (Behera وزملاؤه، 2012)، وقُدر نشاط أنزيم البيروكسيداز وفق المعادلة:

$$\text{نشاط أنزيم البيروكسيداز} = \frac{\text{عامل التمديد} \times \text{كمية الماء الأوكسجيني}}{\text{حجم العينة} \times \text{الزمن}}$$

حيث : كمية الماء الأوكسجيني المنخفضة بين الزمن الأولي والنهائي مقدرة بالنانومول = الامتصاصية عند الزمن 3 دقيقة - الأمتصاصية عند الزمن 0.5 دقيقة، وعامل التمديد = 20 (في اختبارات هذه التجربة تم تمديد العينة 20 مرة ولأجل إعطاء القيمة الحقيقية في 3 مل من المستخلص الإنزيمي).

حجم العينة مقدرة بالمليلتر، وزمن التفاعل: الوقت النهائي (3 دقائق) - الوقت البدائي (0.5 دقيقة) (Sigma-Aldrich، 2014).

النتائج والمناقشة

الشدة الإمراضية (DS) لفيروس موزاييك الخيار على نباتات البندورة الملقحة ببكتريا PGPR:

يتبين من الجدول 1 انخفاض الشدة الإمراضية للفيروس في كل المعاملات المدروسة مقارنةً بالشاهد المعدى بالفيروس فقط،، واختلفت حسب تاريخ أخذ القراءات مع وجود فروق معنوية بين المعاملات المدروسة كافةً مقارنةً بالشاهد المعدى، ووجد في طريقة تلقيح البذور أن أكبر خفض للشدة الإمراضية هو للمعاملات F+CMVs وBF+CMVs وABF+CMVs ، إذ بلغت نسبة الخفض بعد 14 يوماً من العدوى الفيروسية 16.66، 13.33 و13.33% على التوالي، وبعد 28 يوماً من العدوى الفيروسية (30، 21.66 و 20 %) على التوالي، مقارنةً بالشاهد (48.33 و61.66%)، ومع الزمن ازداد خفض الشدة الإمراضية في جميع المعاملات المدروسة. كما وجد من خلال النتائج الموضحة في الجدول 1 أنه بالنسبة لطريقة تلقيح الشتول سُجل أكبر نسبة تخفيض للشدة الإمراضية للمعاملات F+CMVsh وB+F+CMVsh و A+B+F+CMVsh، إذ بلغت بعد 14 يوماً من العدوى الفيروسية 18.33، 16.66 و11.66 %، وبعد 28 يوماً من العدوى الفيروسية 23.33، 18.33و 15 % على التوالي، مقارنةً بالشاهد (48 و61.66). ووجد من خلال النتائج السابقة اختلاف في الشدة الإمراضية للفيروس حسب طريقة التلقيح بالبكتريا (بذور، شتول)، إذ تفوقت طريقة التلقيح بالشتول معنوياً على طريقة التلقيح البكتيري بالبذور في تخفيض الشدة الإمراضية للفيروس وتحفيز المقاومة ضد فيروس موزاييك الخيار. كما تبين أن الأنواع البكتيرية الثلاثة لها القدرة على تخفيض شدة الإصابة الفيروسية، وكان النوع البكتيري *F. aurantia* هو الأفضل في تخفيض الشدة الإمراضية مقارنة بالنوعين الآخرين *B. megaterium* و *A. chroococcum*.

الجدول 1. تأثير بكتيريا PGPR في الشدة الإمراضية لفيروس موزاييك الخيار في نباتات البندورة.

المعاملات	الشدة الإمراضية لفيروس موزاييك الخيار (%) بعد 14 يوماً من العدوى	بعد 28 يوماً من العدوى
A+CMV s	26.66^{ef}	41.66^{c}
B+CMV s	26.66^{ef}	38.33^{c}
F+CMV s	16.66^{ijk}	30de
AB+CMV s	20^{jhi}	33.33^{d}
AF+CMV s	18.33^{hij}	26.66^{ef}
BF+CMV s	13.33^{kl}	21.66^{gh}
ABF+CMV s	13.33^{kl}	20^{ghi}
A+CMV sh	28.33^{e}	38.33^{c}
B+CMV sh	21.66^{gh}	38.33^{c}
F+CMV sh	18.33^{hij}	23.33^{fg}
AB+CMV sh	21.66^{gh}	26.66^{ef}
AF+CMV sh	20^{ghi}	21.66^{gh}
BF+CMV sh	16.66^{ijk}	18.33^{hij}
ABF+CMV sh	11.66^{l}	15^{jkl}
شاهد معدى بـCMV	48^{b}	61.66^{a}
$LSD_{0.05}$	3.48	

Azotobacter chroococcum(A), ***Bacillus megaterium***(B),***Fraturia aurantia***(F), ***Cucumber mosaic virus***(CMV),
تلقيح بذور (s) Inculation seeds, تلقيح شتول (sh) inculation shoots.
القيم التي يتبعها حروف متشابهة في العمود نفسه لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 5%.

وجد في دراسات سابقة (Raupach وزملاؤه، 1996؛ Murphy وزملاؤه، 2003) أن سلالات مختلفة من PGPR أظهرت قدرتها على تحفيز المقاومة ضد فيروس موزاييك الخيار، وكانت شدة الإصابة أقل في النباتات المعاملة بالبكتريا مقارنةً بالشاهد المصاب بفيروس موزاييك الخيار. كما أشار Murphy (2003) إلى أن سلالات من البكتريا المحفزة للنمو قدمت الحماية للنباتات المعاملة بها من فيروس Tomato mottle virus (ToMoV)، إذ خفضت من الشدة الإمراضية للفيروس ضمن ظروف الزراعة المحمية. كما بين Kloepper وزملاؤه (2004) أن الترابط الموجود بين أكثر من سلالة بكتيرية يزيد من مقاومة النبات لمختلف الأمراض وضمن الظروف البيئية المختلفة. كما بين Jetiyanon وزملاؤه (2002) أن تأثير مزيج السلالات البكتيرية التي عوملت بها بذور نباتات الخيار حدّت من الإصابة بفيروس موزاييك الخيار بدرجة أكبر من تأثير كل سلالة لوحدها، وتتوافق نتائج هذه الدراسات التي سبق ذكرها. ووجد El-Douggoug وزملاؤه (2013) خفضاً للشدة الإمراضية لفيرس موزاييك الخيار لدى نباتات الخيار المعاملة بثمانية أنواع من البكتريا المحفزة للنمو. كما تبين من خلال تجربة أجريت ضمن البيوت المحمية أن بكتريا PGPR/السلالة البكتيرية *Bacillus subtilus* IN937b قد حفزت المقاومة لدى نباتات البندورة ضدّ فيروس موزاييك الخيار (Zehnder وزملاؤه، 2000، 2001). وفي دراسة أخرى وجد Mahdy وزملاؤه (2010) أن راشح الكمبوشا Kombosha (خميرة وبكتريا نافعة) قد خفض من الشدة الإمراضية لفيروس موزاييك الخيار. وفي دراسة أخرى مشابهة (El-Douggoug وزملاؤه، 2013) حفزت 5 عزلات مصرية من بكتريا *Streptomyces* spp. المقاومة الجهازية المكتسبة (SAR) ضد الإصابة بفيروس موزاييك الخيار (CMV) لدى نبات الخيار، عن طريق تخفيض الشدة الإمراضية. وفي دراسة أخرى وجد Jacobsen وزملاؤه (2013) أن بكتريا *Bacillus mycoides* السلالة (BmJ)، قد خفضت من نسبة الإصابة بفيروس واي البطاطا Potato virus Y (PVY) في نباتات البطاطا. كما أشار Murphy وزملاؤه (2003) إلى أن الشدة الإمراضية لفيروس موزاييك الخيار، ونسبة تخفيض الإصابة على نباتات البندورة كانت أكبر بعد 14 يوماً من العدوى الفيروسية منها بعد 28 يوماً، وهذا يعود لكون البكتريا المحفزة قد حسنت النمو دون أن تحرض على تشكيل المواد المضادة لتأثير وتضاعف الفيروس، وهذا يتفق مع نتائج هذه الدراسة. كما بيّنوا أن أعراض وشدة الإصابة الفيروسية للنباتات المعاملة بالبكتريا تشبه أعراض وشدة الإصابة عند النباتات البالغة إذ تكون ضعيفة ولا تؤثر في النبات لكونه طور وسائل دفاعية للحماية من الإصابة، وبالتالي تخفيض شدة الإصابة مقارنةً بالإصابة للنباتات الفتية، وهذا يشير إلى أن البكتريا المحفزة لنمو النبات تحفز النبات الفتيّ على تشكيل وسائل دفاعية للحماية من الممرضات بشكل مبكر على غرار النباتات البالغة غير الملقحة بالبكتيريا، مما يسمح بمقاومة المرض والتقليل من أضراره.

تأثير بكتريا PGPR المستخدمة في محتوى حمض الساليسليك في أوراق نباتات البندورة:

يلاحظ من خلال الجدول 2 زيادة محتوى حمض الساليسليك في أوراق نباتات البندورة في المعاملات كافةً في كل من طريقة تلقيح البذور وطريقة تلقيح الشتول مقارنةً بالشاهد السليم والمعدى، وكانت الزيادة الأكبر في المعاملة المختلطة ABF+CMV في كلا الطريقتين، إذ بلغ محتوى حمض الساليسليك في الأوراق 101.63 و 127.24 ميكرو غرام/غ طازج على التوالي، وتفوقتا معنوياً على معاملتي الشاهد السليم والمُعدى إذ بلغ محتوى حمض الساليسليك 33.38 و 81.45 ميكروغرام/غ طازج على التوالي، كما وجد أن طريقة تلقيح شتول البندورة تفوقت معنوياً في محتوى حمض الساليسليك على طريقة تلقيح البذور في المعاملات المدروسة كافةً، كما تبين أن المعاملات التي تحتوي بكتريا *F. aurantia* مفردةً أو مختلطة، تفوقت معنوياً على المعاملة المفردة أو المختلطة بالنوعين البكتيرين *A. chroococcum* و *B.megaterium* في كلتا طريقتي التلقيح (بذور وشتول).

أشار Murphy وزملاؤه (1999و 2004) إلى أن زيادة حمض الساليسليك داخل النبات مرتبط بزيادة المقاومة الجهازية للنبات ضد الممرضات الفيروسية، كما بيّن Naylor وزملاؤه (1998) أن حمض الساليسليك حفز المقاومة الجهازية للنباتات ضد فيروس موزاييك الخيار عن طريق منع الحركة الانتقالية الجهازية للفيروس ضمن النبات، والتي تتأثر بحمض ساليسيل هيدروكساميك. وبيّن Hondo وزملاؤه (2007) أن حمض الساليسيليك حفز تشكيل الجينات المضادة للإمراضية PR1 و PR2 لدى نباتات البندورة. وأشار Choudhary وزملاؤه (2007) إلى أن بعض أنواع بكتريا PGPR حفزت مسار المقاومة الجهازية المكتسبة عن طريق انتاج حمض الساليسيليك على سطح جذر النبات. وتتوافق نتائج دراستنا مع دراسة أخرى مشابهه قام بها El-Douggoug وزملاؤه (2013)، إذ ازداد مستوى حمض الساليسليك الحر داخل نباتات الخيار المعاملة بأنواع من البكتريا المحفزة لنمو النبات والمعداة بفيروس موزاييك الخيار، وحفزت المقاومة الجهازية المكتسبة للنبات، وخفضت من الشدة الإمراضية للفيروس. كما وجد Mahdy وزملاؤه (2010) أن راشح الكمبوشا قد خفض من الشدة الإمراضية لفيروس موزاييك الخيار وترافق مع زيادة في كمية حمض الساليسيليك، وبالتالي وجود مقاومة جهازية مكتسبة (SAR) لدى نباتات البندورة.

الجدول 2. تأثير بكتيريا PGPR في محتوى حمض الساليسيليك في أوراق نباتات البندورة (ميكروغرام/غ طازج)

طريقة التلقيح / المعاملات	تلقيح بذور	تلقيح شتول
A+CMV	93.26[g]	94.44[h]
B+CMV	60.65[b]	82.56[d]
F+CMV	110.53[k]	115.11[i]
AB+CMV	85.13[e]	95.05[h]
AF+CMV	88.34[f]	120.22[m]
BF+CMV	92.60[g]	108.94[j]
ABF+CMV	101.63[i]	127.24[n]
شاهد معدى بـCMV	81.45[c]	
شاهد سليم Control	33.38[a]	
$LSD_{0.05}$	1.034	

***Azotobacter chroococcum*(A), *Bacillus megaterium*(B),*Fraturia aurantia*(F), *Cucumber mosaic virus*(CMV),**
تلقيح بذور Inculation seeds (s), تلقيح شتول (sh) inculation shoots.
القيم التي يتبعها حروف متشابهة في العمود نفسه لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 5%.

تأثير بكتريا PGPR المستخدمة في نشاط أنزيم البروكسيداز في أوراق نباتات البندورة:

وجد من خلال الجدول 3 زيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز في أوراق نباتات البندورة مع التقدم بالزمن، وزيادة نشاطه في كل المعاملات المدروسة مقارنة بالشاهدين السليم والمصاب بعد 14 و28 يوماً من العدوى، وتفوقت معظم المعاملات المدروسة معنوياً على معاملتي الشاهد السليم والمصاب، وسجّل أكبر نشاط للأنزيم لدى المعاملة المختلطة بطريقة تلقيح البذور ABF+CMVs بعد 14 و28 يوماً من العدوى الفيروسية، إذ بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز 0.092 و 0.133 نانومول على التوالي، ولدى المعاملة المختلطة بطريقة تلقيح البذور ABF+CMVsh بعد 14 و28 يوماً بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز 0.102 و0.138 نانومول على التوالي، مقارنةً بالشاهد السليم والمصاب، إذ بلغ نشاط الأنزيم 0.019 و0.044 نانومول بعد 14 يوماً من العدوى و0.035 و0.067 نانومول بعد 28 يوماً من العدوى على التوالي، كما تبين تفوق جميع معاملات طريقة تلقيح الشتول معنوياً على طريقة تلقيح البذور ببكتيريا الدراسة. ووجد لدى المعاملات المفردة بكل نوع من بكتيريا الدراسة تفوقاً واضحاً للبكتيريا *F. aurantia*، تليها البكتيريا *B. megaterium* ، ثم *A. chroococcum*. كما لوحظ تفوق المعاملات الثنائية الملقحة بالبكتيريا في المحتوى الأنزيمي في كلا طريقتي التلقيح والتي تحتوي البكتيريا *F. aurantia* على المعاملات المختلطة التي لاتوجد فيها.

الجدول 3. تأثير بكتريا PGPR المستخدمة في نشاط أنزيم البيروكسيداز في أوراق نباتات البندورة (نانومول).

المعاملات	نشاط أنزيم البيروكسيداز (نانومول) في أوراق نباتات البندورة	
	بعد 14 يوماً من العدوى	بعد 28 يوماً من العدوى
A+CMV s	0.049[e]	0.082[e]
B+CMV s	0.039[b]	0.063[b]
F+CMV s	0.074[h]	0.105[g]
AB+CMV s	0.045[d]	0.076[d]
AF+CMV s	0.081[i]	0.108[h]
BF+CMV s	0.075[f]	0.091[f]
ABF+CMV s	0.092[k]	0.133[l]

A+CMV sh	0.056[f]	0.125[j]
B+CMV sh	0.043[c]	0.067[c]
F+CMV sh	0.099[m]	0.128[k]
AB+CMV sh	0.073[g]	0.103[g]
AF+CMV sh	0.094[l]	0.122[i]
BF+CMV sh	0.083[j]	0.092[f]
ABF+CMV sh	0.102[n]	0.138[m]
معاملة شاهد دون تلقيح بالبكتريا	0.019[a]	0.035[a]
شاهد معدى بـCMV	0.044[cd]	0.067[c]
LSD $_{0.05}$	0.0013	0.0019

***Azotobacter chroococcum*(A), *Bacillus megaterium*(B),*Fraturia aurantia*(F), *Cucumber mosaic virus*(CMV),**
تلقيح بذور (s) Inculation seeds, تلقيح شتول (sh) inculation shoots.
القيم التي يتبعها حروف متشابهة في العمود نفسه لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 5%.

أشار Nie (2006) إلى أن حمض الساليسليك حفز نشاط أنزيم البيروكسيداز ومنع تضاعف وتراكم فيروس البطاطا واي Potato virus Y . كما بيّن Hammerschmidt (2001) وجود ارتباط إيجابي بين زيادة مستوى حمض الساليسليك وزيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز وأنزيم الكيتيناز لدى نباتات الخيار. قام Shahwan (2010) بدراسة تأثير رواشح الكمبوشا (خميرة وبكتريا نافعة) في نباتات البندورة المصابة بفيروس موزاييك الخيار، فتبيّن زيادة في نشاط أنزيمات البيروكسيداز، وفي كمية حمض السالسيليك مع انخفاض الشدة الإمراضية للفيروس، وترافق ذلك مع زيادة اللجنين في جدر الخلايا، مما أثر في انتقال وحركة الفيروس الجهازية ضمن النبات، وزاد من مقاومته للفيروس. كما بيّن El-Borollosy وزملاؤه (2012) عند دراسة تأثير ثلاثة أنواع من بكتريا الرايزوسفير PGPR (*Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* و *Azotobacter chroococcum*) في فيروس موزاييك الخيار CMV لدى تلقيح نباتات الخيار بها أنها خفضت من أعراض الإصابة، كما سببت زيادةً في تركيز أنزيمي b-1,3-glucanase والبيروكسيداز، وتبيّن من النتائج السابقة ومن الدراسات المشابهه أن انخفاض الشدة الإمراضية يتوافق مع زيادة كمية حمض السالسيليك ونشاط أنزيم البيروكسيداز، وهذا يؤسس لتشكيل مقاومة جهازية داخل نباتات البندورة الملقحة بالبكتريا المحفزة ضد فيروس موزاييك الخيار. كما أشار Lancioni (2008) إلى أن آليات المقاومة الجهازية (ISR و SAR) داخل النبات بوجود الممرض وبكتيريا PGPR تتداخل فيما بينها بتكوين التعبير الجيني للمقاومة، وتقدم استراتيجية جديدة في مقاومة الممرضات النباتية.

الاستنتاجات والمقترحات:

1 - خفضت الأنواع البكتيرية الثلاثة من شدة الإصابة بفيروس موزاييك الخيار على نباتات البندورة، وكان أكبر تأثير للمعاملات F+CMV و FB+CMV و ABF+CMV.

2 - أظهر النوع البكتيري *Frateuria aurantia* أكبر زيادة في محتوى حمض السالسيليك ونشاط أنزيم البيروكسيداز في أوراق النبات، تلاه النوع البكتيري *Bacillus megaterium*، ثم *Azotobacter chroococcum*.

3 - ترافقت زيادة كل من محتوى حمض السالسيليك ونشاط أنزيم البيروكسيداز مع انخفاض الشدة الإمراضية للفيروس، وأدت طريقة التلقيح بالبكتريا دوراً مهماً في تخفيض شدة الإصابة الفيروسية، وكانت طريقة معاملة الشتول بعمر 30 يوماً هي الأفضل، وتفوقت المعاملة ABF+CMV على معاملات التجربة كافةً.

وبناءً عليه تقترح الدراسة:

1 - استخدام الأنواع البكتيرية المدروسة معاً في مقاومة فيروس موزاييك الخيار.

2 - إجراء دراسات حول فعاليتها ضد الممرضات الأخرى.

المراجع

- حماد، ياسر و رامز الشامي. 2017. توصيف بعض أنواع بكتريا الرايزوسفير المحفزة لنمو النبات من بعض الأسمدة الحيوية والتربة. مجلة جامعة البعث. سورية. المجلد 39. ص25.
- خليل، حسن. 2007. التحري عن الأمراض الفيروسية على البندورة في المنطقة الوسطى والساحلية. مجلة جامعة البعث. سورية، ، المجلد (29) العدد (2): 231-246.
- المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية. 2014. مديرية الإحصاء والتخطيط، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، الجمهورية العربية السورية.
- Abdel Ghany, T. M.; M. M. Alawlaqi and M. A. Al Abboud. 2013. Role Of Biofertilizers In Agriculture: A Brief Review. Review Article. Mycopath 11, 2: 95-101.
- Agrios, G.N.2005. Plant pathology, 5thed. Elsevier,. 922p.
- Behera, B., S. Ghanty, F. Ahmad, S. Santra and S. Banerjee. 2012. UV-Visible Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Paracetamol Tablet Formulation. Analytical & Bioanalytical Techniques. J Anal Bioanal Techniques. Volume 3 .Issue 6.
- Bouizgarne., B. 2013. Bacteria for Plant Growth Promotion and Disease Management. Springer 454p 40 illus. hardcover.
- Brunt, A., K. Carbtree, M. Dallwitz, A. Gibbs and L. Watson. 1996. Viruses of plants : descriptions and lists from the VIDE database. CAB. International. Printed and bound in the UK at the University press, Cambridge.1484pp.

Cerkauskas, R. 2004. Cucumber mosaic virus (CMV). Published by AVRDC- The World Vegetable Center, P.O. Box 42. Shanhua, Taiwan 741,ROC.
- Chittoor, J.M., J.E. Leach and F.F. White. 1999. Induction of peroxidase during defense against pathogens. In: Pathogenesis: Related proteins in plants. S.K. Datta, S. Muthukrishnan (eds.). CRC Press, Boca Raton, FL. 291 pp.
- Choudhary, D.K. ; A. Prakash. and B.N Johri. 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. Indian Journal of Microbiology. 47 (4): 289-297.
- Ebrahim, Saboki. K.Usha and S. Bhupinder. 2011. Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.pp12.
- El-Borollosy, A. M. and M. M. Oraby. 2012. Induced systemic resistance against Cucumber mosaic cucumovirus and promotion of cucumber growth by some plant growth-promoting rhizobacteria. Faculty of Agriculture, Ain Shams University, Annals of Agricultural Science 57(2): 91–97.
- El-Douggoug, KH. A., A. A. Megahed, B.A. Othman, S.M. Lashin, M.A. Ibrahim and I.H.Attitalla. 2013. Induction of Salicylic Acid in Cucumber Plants Against Cucumber Mosaic Cucumovirus Using Biotic Inducers. American Journal of Biochemistry and Molecular Biology 3(2): 258-255.
- Francki, R.I.B. 1985. The viruses and their taxonomy. In: Polyhedron virions with tripartite genomes Plenum Press (R.I.B. Francki, Ed.), The plant viruses, New York: 1-18.
- Hammerschmidt, R.; E.M. Nuckles. and J. Kuc. 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to Colletotrichum lagenarium. Physiol. Plant Pathol., 20: 73-82.
- Hammerschmidt. R., J.P. M´etraux, and L.C. van Loon. 2001. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May 2000. European Journal of Plant Pathology 107: 1–6.
- Hondo D, S. Hase, Y. Kanayama, N. Yoshikawa, S. Takenaka and H. Takahashi. 2007. The LeATL6 -associated

ubiquitin/proteasome system may contribute to fungal elicitor-activated defense response via the jasmonic acid-dependent signaling pathway in tomato. Mol Plant-Microbe Interact 20:72–81.

- Jacobsen, B., N. Zidack, P. Hamm , and S. Rondon. 2013. Western Region IPM- Integrated Management of PVY-Year 1 Report. HAREC Potato Field Day. P29.
- Jeffries C.J. 1998. Potato. FAO/IPGRI technical guidelines forthe safe movement of germplasm. 19:62–63.

Jetiyanon, Kanchalee and W. K. Joseph. 2002. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. Biological Control 24: 285–291.

- Kawas , H. 2006. Studies on tomato viral diseases in southern Syria, and screening cultivars for resistance to infection with viruses. Ninth Arab Congress of Plant Protection, Damascus, Syria. 19-23 November, 2006, Damascus. Syria.
- Kloepper JW, C.M. Ryu and S.A. Zhang.2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by Bacillus spp. Phytopathology 94: 1259-1266
- Lancioni, P. 2008: Studies on biotic and abiotic elicitors inducing defense responses in tomato. Ph.D. Thesis, Phytopathology Dept., Fac. Agric., University of Bologna, Italy 125pp.
- Lisdiyanti, P.; Y.Yamada,T. Uchimura and K.Komagata 2003. Identification of *Frateuria aurantia* Strains Isolated from Indonesian Sources. Microbiol.Cult. Coll. Vol. 19, No. 2. Dec. 2003. :81 -90.
- Mahdy., A.M.M.; M.A. Hafez, Kh.A. EL-Dougdoug, R.N. Fawzy and Eman S.M, Shahwan. 2010. Effect Of Two Biotic Inducers on Salicylic Acid Induction in Tomato Infected with Cucumber Mosaic Cucumovirus. 3rd Inter. Conf. Virol., Cairo Univ. Center, Nov. 24-25. Egyptian J. Virol, SP. Issue: 355-372.

Maria ,J. Gil and Víctor Martínez-Merino. 2007. Determination of The Free Salicylic Acid Concentration in Aspirin Byforming Fe+3 Complexes. www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/. P8.

- Martelli G. P. and A.Quacquarelli. 1983. The present status of Tomato and pepper viruses. ActaHorticulturae. (ISHS). 127: 39-64.
- Murphy A.M., S. Chivasa, D. P. Singh, and J. P. Carr. 1999. Salicylic acid-induced sistance to viruses and other pathogens: a parting of ways? Trends Plant Sci 4:155–160.
- Murphy A.M., A. Gilliland, C.J. York,and B. Hyman, J. P. Carr. 2004. High-level xpression of alternative oxidase protein sequences enhances the spread of viral vectors in esistant and susceptible plants. J Gen Virol 85:3777–3786.
- Murphy., J. F.; M. S. Reddy, Ch.-M. Ryu, J. W. Kloepper and R. 2003. LI.Rhizobacteria-Mediated Growth Promotion of Tomato Leads to Protection Against Cucumber mosaic virus. Phytopathology. 93. p1301-1307.
- Naylor M., A. M. Murphy, J. O. Berry and J. P. Carr. 1998. Salicylic acid can induce resistance in plant virus movement. Mol Plant Microbe Interact 11:860–868.
- Nie, X . 2006. Salicylic acid suppresses Potato virus Y isolate N:O-induced symptoms in tobacco plants. Phytopathology 96:255–263.
- Raupach, G.,S. Li ,L John, F. Murphy, T. Sadik and W. J. Klopper. 1996. Induced Systemic Resistance in Cucumber and Tomato Against Ccumber Mosaic Cucumovirus Using Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). Plant Dis. 80:891-894.
- Saharan, B. S. and V. Nehra. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research, Volume: LSMR-21.
- Shahwan, E. S., and Moheb El-Din. 2010. Inducing systemic resistance against some tomato virus diseases. DISSERTATION Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for The Degree of doctor of philosophy in plant pathology (Viral Diseases). 256.
- Sigma-Aldrich. 2014. Technical Bulletin- Peroxidase Activity Assay Kit, USA, Catalog Number MAK092, Pp4.

- Singh., J. S. 2013. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Potential Microbes for Sustainable Agriculture. (Central) University, Raibarely Road, Lucknow 226025 Uttar Pradesh, India. 2013.pp7.
- Sivasakthi, S.; G. Usharani and P. Saranraj. 2015. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) Pseudomnas fluorescens and *Bacillus subtils*: A review. African Journal of Agriculture research. 9(16).8: 1265-1277.
- Soleimani, P., G. Mosahebi and M.K.Habibi. 2011. Identification of some viruses causing mosaic on lettuce and characterization of Lettuce mosaic virus from Tehran Province in Iran. Afr. J. Agric.Res. 6 (13): 3029–3035.
- Sutic, P., D.D. For and M.T. Tosic. 1999. Hand book of plant virus diseases. CRC prees. 553pp.
- Technical Data. 2011. Pikovskayas Agar M520. HiMedia Laboratories.. P2.
- Technical Data. 2011.AshbysMannitol Agar M706. HiMedia Laboratories.. P3.
- Van Loon, L.C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. European Journal Plant Pathology, 103:753-765.
- Van Loon, L.C., and E.A. Van Strien.1999. The families of pathogenesis related proteins and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology, 55:85-97.
- Van Loon, L.C., C.M.J Bakker and P.A.H.M. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology, 36: 453-483.
- Zehnder, G. W.; C. Yao, J. F. Murphy, E. R. Sikora and J. W. Klopper. 2000. Inducttion of Resistance in Tomato Against Cucumber mosaic virus by Plant Growth- Promoting Rhizobacteria. Printed in the Netherlands Biocontrol 45: 127-137.
- Zehnder, G. W.; J .F. Murphy,; J. S. Edward, And J. W. Kloepper. 2001. Application of rhizobacteria for induced resistance. European Journal .of Plant Pathology 107:39-50.

N° Ref: 831