تطوير مستحضر حيوي من البكتريا التضاديه لمكافحه مرض سقوط بادرات الطماطه المتسبب عن الفطر

Fusarium oxysporum f.sp lycopersici

اسماعيل عباس جديع/ الجامعه العراقيه/ كليه التربيه - قسم علوم الحياه

المستخلص

اجريت هذه الدراسة لتقويم كفاءة صيغ بكتيريه مختلفة الحوامل على نسبة وشدة الاصابة لمرض الذبول الفيوزارمي على الطماطه، اختبرت القدره التضاديه لعشرين عزله بكتريه معزوله من تربة الرايزوسفير لنباتات الطماطه لمناطق مختلفه من محافظات بغداد ، واسط ، ديالى والنجف ضد الفطر F*usarium oxysporum f.sp lycopersici*. ادت العزلات المختبره الى التثبيط بنسب مئويه مختلفه لمايسليوم الفطر وابواغه الكونيديه . شخصت عزلات البكتريا التي اعطت تضاداً عاليا على انها *Bacillus subtilis* ، *P. putida* ، *Pseudomonas fluorescens* . وجد في جميع الصيغ ان عدد المستعمرات الحيه للبكتريا انخفض تدريجياً مع طول مدة الخزن. اظهرت البكتريا *P.fluorescens* على التالك و *B .subtilis* على طحين كوالح الذره مدة بقاء لاكثر من ثمانية اشهر في تجارب البيت الزجاجي . تطبيق صيغة طحين كوالح الذره الى تربه ملوثه في وقت الزراعه خفض نسبة وشدة الاصابه ٪21.7 و ٪23.7 على التوالي مقارنه مع التطبيق بـ 15 يوم قبل الزارعه (٪26.7 و ٪28.7 على التوالي) .حصل تأثير معاكس في حالة تطبيق صيغة مسحوق التالك في تجارب الحقل . تطبيق صيغة مسحوق التالك عند وقت الزراعه اعطى اقل نسبة وشدة اصابه (٪18 و ٪19 على التوالي) مقارنه بـ 15 يوماً قبل الزراعة (٪25 و ٪26 على التوالي).

Abstract

This study was conducted to evaluate the efficiency of different carrier formulations of antagonistic bacteria on incidence and severity of fusarium wilt disease of tomato.

Twenty isolates of bacteria isolated from rhizosphere tomato plants from different region of the Baghdad, Wasit, Diala and Najaf Governorate were tested in vitro against the growth of *F. oxysporum f.sp lycopersici* . The tested isolates exhibited varied percentages of mycelial and conidial spores fungus. The highly bacteria isolates were identified as *Pseudomonas fluorescens , p.putida* and *Bacillus subtilis*. In all the formulations, anumber of viable colonies of bacteria were decreased gradually with prolonging the storage time in the case of *P.fluorescens* on talk and *B.subtlis* on corn cobs flour formulations, storage time needed to be prolonged up to eight months. in greenhouse experiments, Application of the corncobs flour formulation to the infested soil at the time of planting reduced the incidence and severity 21.7% and 23.7% respectivity compared to an application fiften days before planting (26.7% and 28.7% respectively) .The reverse effect occurred in the case of the talk formulation .In field experiments, application of the talk formulation at the time of planting showed the least incidence and severity (18% and 19% respectively) compared to when it was applied fifteen days before planting. (25% and 26% respectively).

المقدمة

يتعرض محصول الطماطه *(Lycopersicon esculentum Mil)* للاصابه بالعديد من الفطريات المستوطنه للتربه والتي تسبب امراض تعفن البذور وسقوط البادرات وتعفن الجذور ومن اهمها الفطريات *Rhizoctonia solani*، *Fusarium solani* و *F. oxysporum f.sp. lycopersici* . يعد الفطر الاخير من بين اهم الفطريات التي تسبب خسائر اقتصاديه كبيره سواء في الزراعه المحميه او المكشوفه (1،2) . يهاجم الفطر البذور قبل وبعد الانبات فضلاً عن مهاجمة الشتلات عند نقلها الى الحقل المستديم، مما يدفع المزارع الى التعويض عنها بزراعة البذور او الشتلات مره ثانية. على الرغم من تعدد انماط المكافحة الفيزيائيه والكيميائيه والزراعيه والاحيائيه، تبقى المقاومه الوراثيه الحل الامثل اقتصادياً وبيئياً، لكن بفعل تعرض الممرضات للضغط الانتخابي عند شيوع وتكرار زراعة الاصناف المقاومه ادى الى ظهور صفة المقاومه وبالتالي اصبحت هذه الصفه غير معتمده (3، 4) . تعد المكافحة الكيميائيه هي السائده في البلدان الناميه كونها سريعة التأثير ومن جهه اخرى الاعتماد على المبيدات الاحيائيه مازال دون المستوى المطلوب، الا إن المبيدات الكيميائيه غالباً ما تكون غالية الثمن، فضلاً عن مشاكلها البيئيه وتأثرها بظروف التربه الفيزيائيه والحيويه، اضافه الى قدرة الفطر على المقاومه من خلال ظهور السلالات الجديده او تكوين السبورات الكلاميديه مما قلل من اهميتها في المكافحه (5، 6). برزت اهمية وضع استراتيجيات بديله لمكافحة هذا الفطر واحده منها ادخال عوامل المكافحه الاحيائيه في برامج المكافحه المتكامله كاحد الحلول لهذه المشاكل (7، 8، 9، 10) . استخدمت انواع من البكتريا *Bacillus* الموجبه لصبغة كرام والبكتريا *Pseudomonas* السالبه لصبغة كرام في مكافحة العديد من ممرضات النبات ومنها انواع تعود الى جنس *Pythium* , *Fusarium* وادت الى خفض نسب الاصابه وشدتها وتحفيز نمو النبات وزيادة الانتاجيه (11، 12، 13، 14، 15). ان من العوامل المهمه لنجاح المكافحه الاحيائيه هو كيفية صياغة عناصرها بشكل يمكن تداولها وتطبيقها ضمن النظام الزراعي وان يحتوي اللقاح على خلايا عالية الحيوية، استخدمت الصيغ الجافه لهذه المتضادات البكتيريه بشكل فعال في تثبيط نمو العديد من الفطريات الممرضه (13، 14، 16، 17) . فضلاً عن استخدامها كمحسنات تضاف الى التربه لمنع او تحديد نمو الممرض وتحفيز نمو النبات (18، 19، 20) . هدفت الدراسه الى تقويم كفاءة بعض عزلات البكتريا التضاديه ضد الفطر *F. oxysporum f.sp lycopersici* وتقويم كفاءة بعض المواد الحامله كاساس للصيغ الجافه تحت ظروف البيت الزجاجي والحقل وتأثير فترة الخزن على النشاط البايولوجي لها.

المواد وطرائق البحث :

1 – عزل الفطر الممرض وعزلات البكتريا

تم عزل الفطر الممرض *F. oxysporum f.sp lycopersici* من جذور نباتات الطماطه المصابه بشكل طبيعي والتي ظهرت عليها اعراض الذبول، زرعت قطع من الجذور بعد تعقيمها في اطباق حاويه على الوسط الزراعي Potato dextrose agar (PDA)) . شخص الفطر اعتماداً على الصفات المورفولوجيه للمايسليوم والسبورات وحسب المفتاح التصنيفي الموصوف من قبل (21) . اجري اختبار القدره الامراضيه للعزلات على صنف الطماطه المحلي الحساس (سوبر ماريموند) لاختيار اقوى العزلات امراضه، نقيت العزله وحفظت على الوسط الزرعي PDA للدراسات اللاحقه . أما بالنسبه لعزلات البكتريا التضاديه، جمعت عينات من الترب من منطقة الرايزوسفير من حقول مزروعه بمحصول الطماطه ومن مواقع مختلفه من محافظات بغداد، واسط، ديالى، النجف . تم العزل بطريقة زراعة التخافيف على الوسط الزرعي King's B Media و Nutrient Agar والموصوفه من قبل (14). نقيت المستعمرات البكتيريه مره اخرى وكثرت على اطباق حاويه على الوسط الزرعي Nutrient Sucrose Agar (Peptone 5g، Beaf extract 3g ، Sucrose 5g، Agar 20g، 1 لتر ماء مقطر). للاستخدام في التجارب اللاحقه.

2 – تحضير لقاح الفطر الممرض

حضر لقاح الفطر الممرض بتنميته على الوسط الزرعي لبذور الدخن (150 غم بذور دخن، 50 غم رمل، 4 غم كلوكوز، .20 غم مستخلص الخميره، 200 مل ماء)، وضعت في فلاسك سعة 500 مل وعقمت بجهاز المؤصده لمدة 20 دقيقة ولمدة يومين متعاقبين . لقحت الفلاسكات بقطع من الفطر الممرض بقطر 5 ملم (15–10 قطعه) . حضنت بدرجه حراره 25 مo لمدة اسبوعين . تم تحديد الكميه المطلوبه من لقاح الفطر لاعطاء نسبة اصابه اكثر من ٪80 بعد اسبوعين من زراعة بذور الطماطه لاستخدامها في التجارب اللاحقه (14) .

3 – تحضير صيغ البكتريا باعتماد بودرة التالك وطحين كوالح الذره

حضر الوسط الزرعي Nutrient broth ووزع في فلاسكات سعة 500 مل . وضع في كل فلاسك 300 مل. اضيف اليه مادة Carboxymethyl cellulose بمقدار 10 غم كماده ناشره .لقحت هذه الاوساط بقطره من اللقاح البكتيري بشكل منفرد لكل من العزلات البكتيريه الثلاثه المنتخبه وهي *fluorescens Pseudomonas* (عزله13)، *Bacillus Subtilis* (عزله 5) و *P. Putida* (عزله 6). حضنت الفلاسكات بدرجه حراره 25 مo لمدة 48 ساعة مع التحريك المستمر (تحوي الاوساط على 7×810 وحدة تكوين مستعمره/ مل) . حضرت

صيغة التالك بحسب الطريقة المتبعه من قبل (16)، اخذ 1 كغم من مسحوق التالك المعقم بدرجه حراره 105 مo لمدة 12 ساعه واضيف اليه 400 مل من الوسط البكتيري وخلط جيداً. حضرت صغة كوالح الذره الصفراء بأخذ 150 غم المعقمه بجهاز المؤصده واضيف اليه 75 مل من الوسط البكتيري مع الخلط الجيد . عدلت الحموضه لكلا الصيغتين باضافه كميه مناسبه من كاربونات الكالسيوم لجعل الوسط متعادل . جففت الصيغ الناتجه في جهاز Laminar flow hood بحيث تكون الرطوبه بحدود 25٪ . وضعت في اكياس بولي اشيلين وخزنت في 4 مo لحين الاستخدام . بلغت الكثافه السكانيه للبكتبريا في هذه الصيغ 4 × 810 وحدة تكوين مستعمره / غم.

4 - تأثير القدره التضاديه لعزلات البكتريا ضد الفطر الممرض مختبرياً.

سستخدمت تقنية الزرع المزدوج (Dual Cu - ture technique) والموصوفه من قبل (13و14). حضرت اطباق بتري قطر 9 سم حاويه على الوسط الزرعي PDA، لقح في وسط الطبق قرص بقطر 5 ملم من مايسليوم الفطر الممرض بعمر 7 أيام، لقحت عزلات البكتريا بشكل منفرد بالتخفيف 4 × 810 وحدة تكوين مستعمره/ مل على موقعين متقابلين من لقاح الفطر بطريقة التخطيط وبثلاث مكررات لكل عزله بكتيريه. استخدمت اطباق تحوي الفطر الممرض لوحده للمقارنه. حضنت جميع الاطباق بدرجه حراره 24مo وبعد اكتمال نمو الفطر في معامله المقارنه (5يوم)، سجل النمو القطري للفطر لجميع العزلات البكتيريه حسبت نسبة التثبيط لنمو المايسيليوم حسب المعادله الاتيه (13). التثبيط٪ = × 100

اما بالنسبه لتأثير عزلات البكتريا على حيوية ابواغ الفطر فقد اجريت حسب الطريقه الموصوفه من قبل (22) مع بعض التحوير . اخذت زجاجه ساعه ووضع فيها 4مل من المعلق البكتيري بالتخفيف السابق ولكل عزله بشكل منفرد . اخذ بحدود 300-200 بوغ من مزرعه للفطر بعمر 7 أيام (جرى حساب اعداد الابواغ باستخدام شريحة عد الابواغ Haemocytometer وتم التخفيف للوصول الى مستوى 2×710 بوغ/ مل)، خلط المزيج ووضعت زجاجة الساعه الحاويه على الخليط في داخل طبق بتري مغلف من الاعلى والاسفل بورق ترشيح للحفاظ على الرطوبه . وضعت الاطباق بدرجه حراره 25مo لمدة 24 ساعة، مع ترك معامله للمقارنه (سبورات للفطر داخل ماء مقطر معقم). سجل عدد السبورات النابته وغير النابته بعد تصبيغها صصبغة cottonblue المحضره في ماده - Lactoph nol وباستخدام شريحة عد الابواغ . كررت كل عزله 3 مرات وحسبت النسبه المئوية لتثبيط انبات الابواغ حسب المعادله الاتيه: التثبيط ٪ = × 100

تم تشخيص عزلات البكتريا التضاديه التي اعطت اعلى نسبة تثبيط لنمو المايسليوم على اساس الصفات المورفولوجيه والفسيولوجيه والنشاط البايوكيميائي

اعتماداً على (23، 24).

5 – تأثير فترة الخزن على النشاط البايولوجي بالصيغ الجافه لعزلات البكتريا تحت ظروف المختبر.

درست مدة الخزن لصيغتي التالك وطحين كوالح الذره بدرجة حرارة المختبر (2±24م°) للمده من 1–9 أشهر وتأثير ذلك على الكثافه السكانيه لعزلات البكتريا المنتخبه وهي *p. fluorescens* ، *P.putida* *B. subtilis.* باستخدام تقنية التخافيف المتعدده . اخذ 1 غم من كل عينه جافه ولكل صيغه (التالك او طحين الكوالح) على فترات زمنية بمدة شهر لكل فتره ومزج مع 9 مل ماء مقطر معقم ثم عمل منه سلسلة تخافيف. اخذ 1 مل لكل تخفيف بواسطة ماصه ووزع في طبق حاوي على الوسط الزرعي KB، حضنت بدرجه حراره 28م° لمدة 24 ساعة، استخدم 3 مكرر / معامله. سجلت اعداد المستعمرات البكتيريه لكل غم من التالك او طحين الكوالح (14، 25).

6 – تأثير تطبيق البكتريا التضاديه ضد الفطر الممرض تحت ظروف البيت الزجاجي.

نفذت التجربه باستخدام اصص بلاستيكيه (قطر 25 سم) مملؤه بتربه مزيجيه معقمه بجهاز المؤصده (121م° وضغط 15 باوند/ انج2 لمرتين) . لوثت التربه بلقاح الفطر الممرض المحضر سابقاً (فقره – 2) بمعدل 3٪ من التربه (وزن/ وزن) بمدة اسبوعين قبل الزراعه . واضيفت صيغ البكتريا المحضره سابقاً (فقره – 3) الى تربة الاصص الملوثه بالفطر وبمعدل 2٪ من التربه (وزن/ وزن) بأسبوعين قبل زراعة البذور او عند زراعتها . زرع في كل اصيص عشرة بذور معقمة بمحلول هايبوكلورات الصوديوم 2٪ لمدة 2 دقيقه ومغسوله مرتين بماء مقطر معقم مع التجفيف على ورق ترشيح معقم . تركت اصص معامله بالفطر فقط واخرى غير معامله بالفطر او البكتريا للمقارنة . كررت كل معامله ثلاث مرات وسجلت نسب الاصابه بعد 14 يوماً من الزراعه وتم حساب النسب المئويه للاصابه حسب المعادله الاتيه: الاصابه ٪ = × 100

اما شدة الاصابه فقد سجلت بعد 45 يوماً من الزراعه باعتماد تعفن الجذور وحسب المدرج الاتي الموصوف من قبل (5). صفر = لاتوجد اصابه، 1 = 1–25٪ من الجذر متعفن، 2 = 26–50٪ من الجذر متعفن.

3 = 51–75٪ من الجذر متعفن، 4 = 76–100٪ من الجذر متعفن، حسبت شدة الاصابه حسب المعادله الاتيه: شدة الاصابه ٪ = مجموع × 100

7 – تأثير تطبيق البكتريا التضاديه ضد الفطر الممرض تحت ظروف الحقل.

هيئة قطعة ارض مناسبة مزروعه سابقاً بمحصول الطماطه، فتحت سواقي بطول 3م بمسافه 1م بين ساقيه واخرى. تم ري الحقل لتحديد خط الزراعه وبعد يومان عمل اخدود عند خط الزراعه بعمق 8–10 سم . اضيف لقاح الفطر الممرض المحضر سابقاً (فقره– 2) بمقدار 35غم لكل متر طولاً ولجميع المعاملات

. غطي الاخدود بالتربه الرطبه نفسها . اضيفت صيغ البكتريا التضاديه المحضره سابقاً (فقره3-) بمقدار 17غم/ متر طولاً بمدة 15 يوماً قبل زراعة البذور او عند وقت الزراعه وبنفس الخطوط الحاويه على الفطر الممرض، مع ترك خطوط تحوي على الفطر فقط، زرعت البذور في جور المسافه بين جوره واخرى 40 سم، زرع في كل جوره سبعة بذور. كررت كل معامله ثلاث مرات . سجلت نسب الاصابه بعد 21 يوماً من الزراعه وسجلت شدة الاصابه بعد 60 يوماً من الزراعه وباعتماد المعادلات المذكوره في الفقره 6 .

النتائج والمناقشه :

1 - تأثير القدره التضاديه لعزلات البكتريا ضد الفطر الممرض مختبرياً.

اظهرت النتائج المعروضه في جدول (1)، ان جميع عزلات البكتريا قد اظهرت تثبيط متباين معنوياً ضد نمو الفطر الممرض. يمكن تقسيم العزلات الى ثلاث مجاميع رئيسيه، المجموعه الاولى تضم العزلات 13، 14، 16، ذات قدره تثبيطيه اعلى من ٪90. المجموعه الثانيه تضم العزلات 6، 7، 8، 10، 12 ذات قدره تثبيطيه تتراوح من ٪90-80 والمجموعه الثالثه تضم العزلات 1، 2، 5، 9، 15، 19 ذات قدره تثبيطيه تتراوح من ٪80-70، اما من ناحية تثبيط ابواغ الفطر فان قدرة عزلات المجموعة الاولى تراوحت من 86.40 - ٪88.88 وعزلات المجموعة الثانية تراوحت من 85.30 - ٪73.50 وعزلات المجموعه الثالثه 80.60 - ٪69.80 اي انه كان هنالك تفاوت كبير ومعنوي بين عزلات كل مجموعه من حيث القدره التثبيطيه لابواغ الفطر . وقد انتخبت من كل مجموعه رئيسيه عزله واحده اعتماداً على اعلى نسبة تثبيط لنمو الفطر. انتخبت العزله رقم 13 (نسبة تثبيط نمو الفطر ٪96.30 ونسبة تثبيط الابواغ ٪88.88 وشخصت على انها *P. fluorescens* والعزله رقم 5 (نسبة تثبيط نمو الفطر ٪77.83 ونسبة تثبيط الابواغ ٪80.40 وشخصت على انها *B.Subtilis*، والعزله رقم 6 (نسبة تثبيط نمو الفطر 87.63 ونسبة تثبيط الابواغ ٪85.30 وشخصت على انها *p.putida* واستخدمت هذه العزلات في الدراسات اللاحقه.

جدول(1) اثر عزلات البكتريا التضاديه في النسب المئويه لتثبيط نمو المايسليم وحيوية الابواغ للفطر *lycopersici oxysporum f.sp. fusarium* في المختبر

عزلات البكتريا	تثبيط نمو الفطر ٪	تثبيط الابواغ ٪
1	73.73	76.40
2	70.93	69.80
3	42.84	67.20
4	64.3	69.80
5	77.83	80.40
6	87.63	85.30
7	82.63	83.80
8	85.77	84.40

9	75.61	79.30
10	85.96	79.50
11	45.40	66.50
12	82.60	73.50
13	96.30	88.88
14	90.4	84.30
15	73.53	75.50
16	92.66	86.40
17	40.26	66.30
18	55.60	69.10
19	76.53	80.60
20	69.66	70.40
L.S.D	9	8

هذه النتائج تتوافق مع ماوجده (27،26،6) من ان ننواع تعود الى الجنس *Bacillus* والجنس *Pseudo-monas* لها القدره على انتاج مضادات حياتيه قادره على تثبيط واحد او اكثر من الفطريات الممرضه او انتاج انزيمات محلله مائياً تعمل على تحطيم جدران الخلايا، او انتاج مركبات السديروفورس الماسكه للحديد مما يمنع وصوله للفطر الممرض وهذه ستنعكس على قدرة الفطر في انتاج الابواغ او التأثير على الحيويه ومنع الانبات.

2- تأثير فترة الخزن على النشاط البايولوجي بالصيغ الجافه لعزلات البكتريا تحت ظروف المختبر.

اظهرت نتائج جدول (2) ان عدد المستعمرات الحيه لعزلات البكتريا المنتخبه في جميع الصيغ الجافه قد انخفض تدريجياً مع اطاله فترة الخزن لاكثر من ستة اشهر وبدرجة حراره الخزن المختبريه، فقد وصل عدد المستعمرات الحيه للعزلات المنتخبه وفي جميع الصيغ الى 2×310 وحدة تكوين مستعمره/ مل خلال الشهر السابع وهذا التخفيف يكون غير فعال ويحتاج الى تنشيط قبل استعماله ولم نحصل على اي خلايا بكتيريه خلال الشهر الثامن باستثناء البكتريا *P. fluorescens* على مادة التالك و *B.subtilis* على طحين كوالح الذره اذ بلغ عدد المستعمرات الحيه في الشهر السابع 5×105 و 1.25×106 وحدة تكوين مستعمره/ مل على التوالي، وعلى الرغم من انخفاض عدد الوحدات في الشهر الثامن إلا انهما بمستوى جيد من الفعاليه وقد يعود سبب بقاء البكتريا *P.fluorescens* فعاله لاكثر من سبعة اشهر الى ان خلاياها تحاط بسكريات متعدده خارجيه تحميها من الظروف غير المناسبه كما ان مادة التالك قد تكون اكثر ملائمه لحماية الخلايا لهذه البكتريا. كما ان البكتريا *B.subtilis* معروفه بتكوينها سبور داخلي يساعدها على البقاء لفترة اطول وربما تكون مادة طحين الكوالح اكثر ملائمه لحمايتها . ان هذه النتائج تتوافق مع ماوجده (13) من ان البكتريا *P.fluorescens* تبقى فعالى على مادتي التالك وطحين الخشب لاكثر من سبعة اشهر كما وجد (28) ان البكتريا *P.fluorescens* تبقى فعاله على مادة النشأ المحلي لمدة سسعة اشهر، كذلك وجد (14) ان البكتريا *Pseudo-*

monas spp. و *B.subtilis* تبقى فعاله لمدة ستة اشهر على مادتي التالك والبتموس وبكثافه سكانيه 10^{8} وحدة تكوين مستعمره/ غم من الماده الكامله.

جدول (2) اثر فترة الخزن في حيوية الصيغ البكتيرية.

صيغ البكتريا	وحدة تكوين مستعمره/ مل بفترات خزن (شهر) 0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pf+تالك	3×10^{9}	2.7×10^{7}	2.5×10^{7}	2×10^{7}	1.7×10^{7}	1.2×10^{7}	1×10^{7}	5×10^{5}	2.5×10^{5}	1×10^{2}
Pf+كوالح الذره	3×10^{9}	6.3×10^{7}	6×10^{7}	5×10^{7}	2.5×10^{7}	2×10^{7}	7×10^{6}	2×10^{3}	0	0
BS+تالك	3×10^{9}	2.8×10^{7}	2.6×10^{7}	2×10^{7}	1.6×10^{7}	1.5×10^{7}	3×10^{6}	2×10^{3}	0	0
BS+كوالح الذره	3×10^{9}	4×10^{7}	3.1×10^{7}	2.5×10^{7}	2.2×10^{7}	1.5×10^{7}	1.3×10^{7}	1.25×10^{6}	5×10^{5}	1×10^{2}
Pp+تالك	3×10^{9}	3.5×10^{7}	2.5×10^{7}	1.4×10^{7}	1.3×10^{7}	1×10^{7}	3×10^{6}	2×10^{3}	0	0
Pp+ كوالح الذره	3×10^{9}	5.9×10^{7}	5.2×10^{7}	5×10^{7}	4.5×10^{7}	3.5×10^{7}	9×10^{6}	2×10^{3}	0	0

pf = *Pseudomonas fluorescens*⁎

BS = *Bacillus Subtilis*

Pp = *Pseudomonas Putida*

3 - تأثير تطبيق البكتريا التضاديه ضد القطر المرض تحت ظروف البيت الزجاجي.

اظهرت النتائج في جدول (3) ان اضافة صيغ التالك او طحين الكوالح لعزلات البكتريا المنتخبه الى تربه ملونه بالفطر المرض قدادت الى خفض معنوي عالي لمرض الذبول الفيوزارمي مقارنه بمعامله التربه الملوثه بالفطر المرض فقط. ان الصيغه التي اساسها التالك ادت الى خفض معنوي لنسبة الاصابه من 42٪ عند استخدام البكتريا مع الزراعه الى 25٪ عند استخدامها قبل الزراعه بـ 15 يوماً اما عند استخدام الصيغه التي اساسها طحين الكوالح فقد حصل العكس اذا ادت الى خفض نسبة الاصابه من 26.7٪ عند استخدام البكتريا قبل الزراعه بـ 15 يوماً الى 21.7٪ عند استخدامها مع الزراعه وبشكل معنوي. ادت صيغة طحين الكوالح الى خفض معنوي بنسبة الاصابه (24.2٪) بالمقارنه مع صيغة التالك (33.5٪)، ادت البكتريا *P.fluorescens* الى خفض معنوي في نسبة الاصابه (26.5٪) عما هو عليه في البكتريا *P.putida* (29.5٪) والبكتريا (30.3٪ *B.subtilis*).ادت الصيغه الجافه التي اساسها طحين الكوالح الى خفض شدة الاصابه من 28.7٪ عند استخدامها قبل الزراعه

بـ 15 يوماً الى ٪23.7 عند استخدامها مع الزراعه . اما عند استخدام الصيغه التي اساسها التالك فقد ادت الى خفض شدة الاصابه من ٪43.7 عند استخدامها مع الزراعه الى ٪27.3 عند استخدامها قبل الزراعه بـ 15 يوماً وبشكل معنوي . ادت صيغة طحين الكوالح الى خفض شده الاصابه (٪26.2) بالمقارنه مع صيغة التالك (٪35.5) . ادت البكتريا *P.fluorescen* s الى خفض شدة الاصابه الى ٪28.8 مقارنه بالبكتريا ٪31.5) *p.putida*) والبكتريا *B.subtilis* ٪32.3)) وبشكل معنوي . هذه النتائج تشير الى فعالية جميع عزلات البكتريا المنتخبه وفعالية صيغها سواء استخدمت قبل الزراعه او اثناء الزراعه، كما يلاحظ تفوق عزلتي الـ *Pseudomonas* على بكتريا الـ *Bacillus* في خفض نسبة الاصابه وشدتها وهذا قد يعود الى ان البكتريا الـ *Bacillus* تكون سبورات داخليه تحتاج الى انبات ثم تكوين خلايا خضريه ومن ثم استيطان البذره ثم الانتشار في منطقة الرايزوسفير وبعدها تقوم بتخليق المضادات الحياتيه في الوقت لمنع لالاصابه وهذه فتره طويله مقارنه لمجموعة الـ *Pseudomonas*.هذه النتائج تتوافق مع نتائج باحثيين اخرين (8، 10، 26، 29) من ان استخدام البكتريا المحفزه لنمو النبات والمستوطنه في التربه قد ادى الى كبح الممرضات الفطريه ومنها انواع تعود الى الجنس *Fusarium* من خلال عدة اليات منها افراز المضادات الحياتيه والمنافسه على الموقع والغذاء وتحفيز نمو النبات واستحثات المقاومه الجهاريه.

جدول (3) اثر تطبيق صيغ البكتريا التضاديه في شدة ونسبة الاصابه بمرض الذبول الفيوزارمي على الطماطه تحت ظروف البيت الزجاجي

المعاملات	نسبة الاصابة ٪					شدة الاصابة ٪				
	طحين الكوالح		التالك		المعدل العام	طحين الكوالح		التالك		المعدل العام
	قبل الزراعه	مع الزراعه	قبل الزراعه	مع الزراعه		قبل الزراعه	مع الزراعه	قبل الزراعه	مع الزراعه	
الفطر الممرض فقط	80	80	80	80	80	73	73	73	73	73
Pseudomonas fluorescens	8	25	6	67	26.5	10	27	9	69	28.8
Bacillus Subtilis	39	7	25	50	30.3	41	9	27	52	32.3
Pseudomonas putida	33	33	44	8	29.5	35	35	46	10	31.5
المعدل لمعاملات البكتريا فقط	26.7	21.7	25	42		28.7	23.7	27.3	43.7	

المعدل لمعاملات البكتريا فقط	24.2	33.5		26.2	35.5	
قفل فرق معنوي عند مستوى ٪5 لعزلات البكتريا = 0.6 – ycope sici لعديد من الفطريات المستوطنه للتربه والتي تسبب امراض تعفن البذور وسقوط البادرات وتعفن الجذور ومن اهمها الفطريات ابه (1 اقل فرق معنوي عند مستوى ٪5 لمواعيد الاضافه = 3.5 اقل فرق معنوي عند مستوى ٪5 للماده الحامله = 6.5				اقل فرق معنوي عند مستوى ٪5 لعزلات البكتريا = 0.5 اقل فرق معنوي عند مستوى ٪5 لمواعيد الاضافه = 3.3 اقل فرق معنوي عند مستوى ٪5 للماده الحامله = 5.5		

4 – تأثير تطبيق البكتريا التضاديه ضد الفطر الممرض تحت ظروف الحقل.

اظهرت نتائج جدول (4) ان اضافة صيغ البكتريا التضاديه الى تربه ملوثه بالفطر الممرض قد ادى الى اختزال في نسب الاصابه وشدتها مقارنه مع معاملة الفطر لوحده . ادى استخدام الصيغه التي اساسها طحين الكوالح الى خفض معنوي لنسبة الاصابه من ٪22.3 عند استخدامها قبل الزراعه بـ 15 يوماً الى ٪19 عند استخدامها مع الزراعه. على العكس من ذلك فأن استخدام الصيغه التي اساسها التالك ادت الى خفض نسبة الاصابه من ٪25 عند استخدامها قبل الزراعه بـ 15 يوماً الى ٪18 عند استخدامها مع الزراعه . اما الصيغه التي اساسها التالك فقد ادت الى نسبة اصابه ٪21.5 مقارنه مع الصيغه التي اساسها طحين الكوالح (٪20.7)، ادت البكتريا *P.fluorescens* الى خفض نسبة الاصابة الى ٪18.3 مقارنه مع البكتريا ٪20.8 (*P.putida*) والبكتريا ٪23.5 (*B.subtlis*) وبشكل معنوي، ادى استخدام صيغ البكتريا الى خفض شدة الاصابه مقارنه بمعاملة الفطر الممرض لوحده، فقد اظهر الجدول ان الصيغه التي اساسها طحين الكوالح قد ادى الى خفض شدة الاصابه من ٪23 عند الاضافه قبل الزراعه بـ 15 يوماً الى ٪20 عند الاضافه مع الزراعه في حين ان الصيغه التي اساسها التالك قد ادت الى خفض شدة الاصابه من ٪26 عند الاضافه قبل الزراعه بـ 15 يوماً الى ٪19 عند الاضافه مع الزراعه. ادت صيغه طحين الكوالح الى خفض شدة الاصابه الى ٪21.5 مقارنه مع مادة التالك (٪22.5) . ادت البكتريا *P.fluorescens* الى خفض شدة الاصابه الى ٪19.5 مقارنه مع البكتريا ٪21.8 (*P.putida*) والبكتريا *B.subtilis* ٪24.8)) يلاحظ من الجدول ان انواع البكتريا *Pseudomonas* اكثر تفوقاً في خفض نسب وشدة الاصابه وهذا قد يعود الى انها لاتكون سبورات داخليه وبالتالي فانها لاتحتاج الى تكوين خلايا خضريه ومن ثم الانبات والانتشار في منطقة الرايزوسفير وبالتالي ستكون الفتره اللازمه لافراز المضادات الحياتيه قليله (14).هذه النتائج تتفق مع نتائج عدد من الباحثيين الذين اشاروا الى استخدام عزلات تعود الى جنسي البكتريا المدروسة

في مكافحة العديد من مسببات الامراض النباتيه التي مصدرها التربه، كما ان صيغ البكتريا قد حسنت الثباتيه ومدة بقاء البكتريا لفتره اطول في التربه (14، 17، 26). سجل تطبيق صيغ البكتريا باستخدام طحين الخشب، التالك، النشأ، طحين الكوالح، قشور الرز وادت الى خفض نسبة وشدة الاصابه (13، 14، 28).

جدول (4) اثر تطبيق صيغ البكتريا التضاديه في شدة ونسبة الاصابه بمرض الزبول الفيوزارمي على الطماطه تحت ظروف الحقل

المعاملات	نسبة الاصابة ٪					شدة الاصابة ٪				
	طحين الكوالح		التالك		المعدل العام	طحين الكوالح		التالك		المعدل العام
	قبل الزراعه	مع الزراعه	قبل الزراعه	مع الزراعه		قبل الزراعه	مع الزراعه	قبل الزراعه	مع الزراعه	
الفطر الممرض فقط	80	80	80	80	80	87	87	87	87	87
Pseudomonas fluorescens	8	24	28	16	18.3	7	25	29	17	19.5
Bacillus Subtilis	23	18	23	39	23.5	25	19	24	31	24.8
Pseudomonas putida	36	15	24	8	20.8	37	16	25	9	21.8
المعدل لمعاملات البكتريا فقط	22.3	19	25	18		23	20	26	19	
المعدل لمعاملات البكتريا فقط	20.7		21.5			21.5		22.5		
اقل فرق معنوي على مستوى ٪5 للعزلات = 1.8 ycopersiciلعديد من الفطريات المستوطنه للتربه والتي تسبب امراض تعفن البذور وسقوط البادرات وتعفن الجذور ومن اهمها الفطريات ابه (1 اقل فرق معنوي على مستوى ٪5 لمواعيد الاضافه = 2.1 اقل فرق معنوي على مستوى ٪5 للماده الحامله = 0.6						اقل فرق معنوي عند مستوى ٪5 لعزلات البكتريا = 1.9 اقل فرق معنوي عند مستوى ٪5 لمواعيد الاضافه = 2.4 اقل فرق معنوي عند مستوى ٪5 للماده الحامله = 0.6				

المصادر

1 - جديع، اسماعيل عباس ; موسى، شيماء عبد اللطيف ; علي، عفراء عبد الوهاب وعباس، بلاسم احمد . 2009 . المكافحه المتكامله لمرض الذبول الفيوزارمي على الطماطه بالتوافق بين البكتريا *pseudomonas fluorescens* والفطر *Trichoderma harzianum* تحت الظروف الحقليه. مجلة الزراعه العراقيه . مجلد 14 (3): 10-1.

2 - Roberts,D.P.; Lohrke, S.M.; Meyer,S.I. and Bowers, J.H.2005. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soil born diseasses of tomato. crop prot. 24 (2): 141-155.

3 - Fravel, D.; Olivain , C. and Alabonvette, C.2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New phytologists. 157: 493-502.

4 - Lugtenberg, B. and Kamilova, F.2009. Plant-growth promoting rhizobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 63: 541-556.

5 - Rajput, N.A.; pathan, M. and Arain , R.R. 2008. pathogenicity and host range of *Fusarium solani* causing dieback of shisham. plant pathol. 40(I): 2631-2639.

6 - Leisso, R.S. ; Miller, P.R. and Burrows, M.E. 2009. The influence of biological and fungicidal seed treatments on chickpea damping-off. can. J.Plant pathol. 31: 38-46.

7 - Sallam,N.; Abd-El.Razik, A. and Koch , E.2009. Powder *formulations of Bacillus subtlis* , *Trichoderma* spp. for biocontrol of onion white rot. Archiv. phytol. plant. prot. 42(2): 142-147.

8 - Amer, G.A. and Utkehede, R.S. 2014. Development of formulations of biological agents for management of root rot of tomato and cucumber. can. J.Microbiol. 46(9): 809 – 816.

9 - Salman, M.and Abuamsha, R. 2012. Potential for integrated biological and chemical control of damping- off disease caused by *pythium ultimum* in tomato. Biocontrol 57: 711-718.

10 - Xu, X.M.; Jeffries, P. and jeger, M.J. 2011. combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. phytopathol. 101: 1024-1031.

11 - EL-Hassan, S.A. and Gowen, S.2006. Formulation and delivery of the antagonist Bacillus subtlis for management of lentil vascular wilt caused by *Fusariurm oxysporum* f.sp lentils. J. of phytopath. 154: 148-155.

12 - Haas, D. and Defago, G.2005. Biological control of soil-born pathogens by fluorescent pseudomonads. Nat. Rev. microbiol. 3(4): 307-319.

13 - Sallam, N.A.; Riad, S.N. and El-eslam, A.S.2013. Formulations of *Bacillus* Spp and *Pseudomonas fluorescens* for biocontrol of cantaloupe root rot caused by Fusarium solani.J. of plant protect. Res.53(3) 295-300.

14 - Khabbaz, S.E. and Abbasi, P.A.2014. Isolation, characterization, and formulations of antagonistic bacteria for the management of seedlings damping off. and root rot disease of cucumber. can. J.Microbiol 60: 25 -33.

15 - Zhang, L;khabbaz, S.E. and Abbasi, P.A. 2015. Detection and characterization of broad-spectrum antipathogen activity of novel rhizobacterial isolates and suppression of Fusarium crown and root rot disease of tomato. J. of Applied Microb. 118(3):685-703.

16 - Khabbaz,S.E.; Zhang, L.A. and Abbasi,

24 - Sneath, P.H.A; Mair, N.S.; Elisabeth sharpe,M.and Holt,J.G. 1986. Endospore- forming gram – positive rods and cocci. P.1105-1207 . In "Bergey's manual of systematic Biology (N.R.Kreig,J.G Holt, eds) Baltimore, The Williams and wilkins co. 1388 PP.

25 - Jayaraj, J.; Parthasarathi, T. and Radhakrishnan, N.V.2007. Characterization of Pseudomonas *fluorescens* strain from tomato rhizosphere and its use for integrated management of tomato damping off Biocontrol ,52: 683-702.

26 - Santoyo,G. and Govindappa, M.2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: Areview Biocontrol Sci. Technol.,22: 855 – 972.

27 - Debode, J., DeMayeyer, N. and Hotte, M.2007.Biosurfactants are involved in the biological control of *Fusarium oxysporum* by Pseudomonas spp. J.Appl. Microbiol., 103(4): 1184-1196.

28 - الدليمي، اسماعيل عباس، موسى، شيماء عبد اللطيف واحمد، سمير محمد. 2003. تطوير وتقويم مستحضر جاف من البكتريا *Pseudomonas fluorescens* مجلة الزراعة العراقيه، 8(3): 104 – 110.

29 - Sama, M.K.; Kumar, V.; Sahai, V. and Bisaria, V.S 2011. Application of inorganic Carrier based formulation of Pseudomonas fluorescent and *Bacillus* cereus on tomato plants and evaluation of their efficacy. J. Appl. microbiol. 111: 456-466 .

Development of bioformulation of antagonistic bacteria for biocontrol of tomato damping-off caused by *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

I.A.Jdayea, Al-iraqia University, Colleg of education, Biology Department

P.A.2015. Characterization of antagonistic Bacillus and pseudomonas strains for biocontrol potential and suppression of damping-off and root rot diseases. Annals of Applied Biology 166 (3): 466-471.

17 - Kavitha, K.; Mathyzhagan, S. and chandrasekar, G.2005. Development of bioformulations of antagonistic bacteria for the management of damping- off of chili-Arch. phytopathol. plant prot.38: 19 -30.

18 - Vidhyasekaran, P. and Muthamilan, M.1999. Evaluation of powder formulations of *pseudomonas flourescens* Pfi for control of rice sheath blight. Biocontrol sci and Technol. 9: 67-74.

19 - Abbasi,P.A.l Lazarovits, G.and conn,K.I.2008. Enhancing biological control of soil.borne plant diseases by organic amendments. In plant-microbe interactions. Ed.E.A. Barka and C.clement. Research signpost Kerala, India. PP.319-343.

20 - Wiyono,S. Schulz, D.F. and wolf , G.A.2008.Improvrment of the formulation and antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* B5 through selective additives in the pelleting process. Biological control 46 (4) :348-357.

21 - Both, C.1971. The Genus Fusarium, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey , England 237 PP.

22 - Srivastava, R. and Shalini, A.2008. Antifungal activity of *Pseundomonas fluorescens* against different plant pathogenic fungi. EJEAFche, 7(4): 2789 – 2796.

23 - Palleroni, N.J. 1984. Pseudomonadaceae. P.141-199.in:"Bergey's Manual of systematic Biology"(N.R.Kreig,J.G Holt, eds) Baltimore, The Williams and wilkins co. 1388 PP.