أختبار كفاءة عزلات من البكتيريا *Bacillus subtilis* والفطر *Trichoderma hrzianum* في استحثاث بعض

انزيمات الدفاعية ضد الفطر *Alternaria solani* في نبات الطماطة^(١)

ورقاء سعيد قاسم الطائي

هيام عادل إبراهيم الطائي

علاء حميد محمد الحفاجي

كلية العلوم / قسم علوم الحياة

كلية الزراعة والغابات / قسم وقاية النبات

جامعة الموصل

(قدم للنشر في ٢٠١٩/٣/١٤ ، قبل للنشر في ٢٠١٩/٤/١٦)

ملخص البحث: أجري البحث في الظلة البلاستيكية التابعة لقسم وقاية النبات خلال ٢٠١٧ - ٢٠١٨ وأجريت الدراسة للحصول على عزلات محلية للبكتيريا *Bacillus subtilis* معزولة من التربة كقوة في مكافحة الأحيائية لمرض الفحة المبكرة المسبب عن الفطر *Alternaria solani* والمعاملة بالفطر *Trichoderma hrzianum* واستخدمت عوامل المكافحة بشكل مفرد وكذلك مخلوطة مع بعض . أثبتت نتائج الفحص المجهرى وكذلك الاختبارات الكيموحيوية بأن العزلات تعود الى نوع البكتيريا *Bacillus subtilis* . كما وبينت النتائج قدرة عوامل المكافحة الأحيائية على استحثاث مقاومة نبات الطماطة الجهازية من خلال رفع فعالية الأنزيمات البيروكسديز والبولي فينول اوكسديز والكاليز في أوراق نبات الطماطة فقد حققت المعاملة بالبكتيريا *Bacillus subtilis* ٢ والمعاملة بالفطر *Trichoderma hrzianum* بشكل مفرد ومعاملتهم قبل المعاملة بالفطر *Alternaria solani* بثلاثة ايام ومعاملة البكتيريا *Bacillus subtilis* ١ بشكل مفرد ومعاملتها بعد المعاملة بالفطر *Alternaria solani* بثلاثة أيام تفوقا معنويا على جميع المعاملات في زيادة فعالية انزيم البيروكسديز والذي بلغت ١.٢٦٣ ، ١.٣٥٨ ، ١.٢٨٦ (دقيقة / غرام وزن رطب) على التوالي مقارنة مع المعاملة الملوثة بالفطر المرض فقط والتي بلغت فيها فعالية أنزيم البيروكسديز ٠.٠٨١ (دقيقة / غرام وزن رطب) .

الكلمات المفتاحية: الفحة المبكرة ، أنزيمات استحثاث المقاومة الجهازية ، *Bacillus subtilis*

The Efficiency of local Isolates of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma hazianum* in the induction of some Defesive Enzymes to control *Alternaria solani* in Tomato plant

Abstract: The study was conducted in the plant protection greenhouse department's during 2017-2018. The study investigated two local isolates of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma hazianum* to evaluate their efficacy as biocontrol agents in controlling early blight disease caused by *Alternaria solani*. The results of the microscopic and biochemical tests showed that the isolates belonged to *B. subtilis*. The results indicated that these biocontrol agents could stimulate the resistance of systemic tomato plant by increasing the effectiveness of peroxidase, polyphenols oxidase and catalase enzymes in tomato leaves. The highest increase in the efficacy of peroxidase was 1.286 and 1.358 (min / g wet weight) respectively when treated with Bacterial isolation II and *T. hazianum* separately by three days before infection with *A. solani* , while the increase was 1.263 (min / g wet weight) When treated with the Bacterial isolation compare infection of *A. solani* after three days the enzyme efficacy in the control treatment, which amounted to 0.181.

(١) مستل من اطروحة الدكتوراه للباحث الأول .

pyrone 6 – pentyl -1- و Harzianopyridane
1-B- A و koningne والتي تعتبر نواتج للأبيض الثانوي الذي
جلعت من هذا الفطر واسع التطفل على مجموعة من الممرضات
الفطرية *Sclerotina* و *Macrophomina* و *Rhizoctonia* و *Pythium* و *Botrytis* و
و *Rhizopus* وغيرها (Graza - Gracia) واخرون
1997 و Pezet واخرون, 1999). تمتاز البكتريا *Bacillus*
subtilis بعدة آليات جعلتها مهمة في برنامج مكافحة الحيوية إذ
تحلل جدار الخلية الفطرية وذلك بإفراز انزيم الكايتينز و-B1
3Glucanase و pr-proteins و Peroxidase كما
وتعتبر متطفل حيوي واسع الطيف ضد مجموعة كبيرة من الفطريات
وذلك لها القدرة العالية على التنافس كما وتنتج البكتريا
Bacillus subtilis مادة Hurin المثبطة لنمو كثير من
الفطريات كما وان هذه البكتريا لها قدرة في انتاج مجموعة واسعة
من المضادات الحيوية ومنها Bacitracinltutin و
Subtenoline و Bacilin و Subtiline و
Bacillomycin و Fencycin و Bacitractin و
Polymyxin و Mycosubtilin و Gramicidin
وان هذه المضادات تعمل على تشوه قمع النمو من خلال تحلل

عرف Cook (1994) المكافحة الأحيائية على أنها
استخدام كائنات حية مضادة للممرضات النباتية وتنتشر في البيئة
بسرعة وان تكون متخصصة وذات تأثير طويل وان لا تؤدي إلى اي
اضرار على النبات والبيئة وتم السيطرة الحيوية على ممرضات
النبات من خلال عدة آليات . أذ يمتاز الفطر *Trichoderma*
بعدة آليات جعلت منه متطفل ناجحاً في مجال المكافحة الحيوية إذ
ينافس الممرض على العناصر الغذائية واهمها النيتروجين والكربون
إذ يدخلان في نمو وتكاثر ممرضات النبات ويحتل مساحة واسعة في
بيئة النبات ومنطقة تواجدته وذلك لسرعة نموه وانتشاره الواسع في
ذلك المكان كما ويمتاز بقدرة عالية على افراز الانزيمات واهما
السيلوليز وكذلك B1-3Gluconase و Chaitinase و
Pectinase (1998, Larito, LO واخرون 2000)
كذلك قدرة على انتاج مجموعة من المضادات ذات التأثير التثبيطي
العالي للممرضات النباتية ومنها Gliotoxin و Demadina
و Sesquiterence و Trichodermina,
و ALkypyronas و Acetaldehyde (Almassi
واخرون, 1991, Harman, 2000) كما ويمتاز الفطر
Trichoderma بقدرة على افراز السموم مثل

يؤثر هذا المرض بشكل سلبي على إنتاجه من حيث كانت نوعية أو كمية الطماطة في مختلف بلدان العالم سواء كانت العربية منها أو العالمية (Waals وآخرون ٢٠٠٤ و pevalta وآخرون ٢٠٠٥ وعلي وآخرون ٢٠٠٧).

مواد البحث وطرقه

عزل البكتريا من التربة:

جمعت عينات العزل من ثلاثة مناطق مختلفة كما في الجدول (١) وذلك بقشط (١) سم من سطح التربة وأخذت بعمق يتراوح بين (٥-١٠) سم وبواقع (١٠) غم من كل موقع ووضعت في كيس نايلون معقم وسجل عليه المعلومات الآتية رقم النموذج نوع الحصول المعزول وحضرت سلسلة من التخفيف العشرية وذلك بإضافة ٠.١ مل من التخفيف العشري ١٠^{-٤} إلى سطح الوسط المغذي Nutrient Agar وحضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٠ سيليزية لمدة ٢٤-٤٨ ساعة ثم نقلت كل مستعمرة بكتيرية نامية إلى نفس الوسط الذي عزلت عليه لغرض التنقية وحفظت على موائل الوسط المغذي NA بدرجة ٤ سيليزية لحين الاستعمال.

سايوبلازم هايفات الفطر كما فضلا عن ابعاد الممرض من منطقة الجذر لكثافتها ونموها السريع واتاجها هيدروكسيد السيانيد HCN و Siderophores وتنشط مقاومة النبات الجهازية وتحفيزها باستحثاث المقاومة بزيادة فعالية انزيمات الكاليز والبيروكسيد وفنيل الأئينين أمونيايز و تنظم جينات المقاومة وذلك للزيادة الحاصل في فعالية Promoter وتنقل اشارة الحث وتحفز مقاومة النبات عن طريق تكوين بيروكسيد الهيدروجين في جذور النبات (Stabble و Handelsmann, ١٩٩٦, Alkpa وآخرون, ٢٠٠١ و Bargabus وآخرون, ٢٠٠٧ و Jamil, ٢٠٠٧ و Athukorala وآخرون, ٢٠٠٩ و Yousefi وآخرون, ٢٠١٠ و Sansinenea و Ortiz, ٢٠١١). ومن هنا هدفت هذه الدراسة الى عزل البكتريا من تربة ثلاثة مناطق واستخدام الفطر *Trichoderma* ضد الفطر *Alternaria solani* الذي يسبب مرض الفحة المبكرة Eerly Blight على الطماطة وقدرة تلك العزلات على استحثاث انزيمات المقاومة الجهازية في الطماطة والذي يعد هذا المرض أكثر امراض التبغ شيوعا على نباتات الخضر الباذنجانية اذ

الخنفاجي وآخرون: اختبار كفاءة عزلات من البكتيريا . . .

الجدول (١) مناطق عزل البكتريا

نوع المحصول المزروع	رقم العزلة	المنطقة
حنطة	١	الجزيرة
طماطة	٢	القيارة
حمضيات	٣	الموصل
تم الحصول عليها من الاستاذ المساعد الدكتور رجاء غازي عبد المحسن/قسم وقاية النبات/كلية الزراعة/جامعة كربلاء		<i>Bacillus Subtilis</i>

تشخيص البكتيريا:

الخصائص المظهرية والكيموحيوية : درست صفات المستعمرات البكتيرية النامية على الوسط الزرعي (NA) من حيث اللون والحواف، الشفافية، القوام، الرائحة، الحجم وفحصت الصفات المظهرية المجهرية بعد تصبغها بصفة كرام وملاحظة تفاعلها مع الصبغات وشكل الخلايا وتجمعاتها واختبرت التفاعلات الكيموحيوية للبكتريا (Collins و Lune, ١٩٨٥).

استخدام عوامل المكافحة الاحيائية (*Trichoderma* و *Bacillus*) في مكافحة الفطر *Alternaria Solani* في الظلة البلاستيكية قبل المعاملة بالفطر المرض وبعد المعاملة بالفطر المرض بثلاثة أيام على الصنف سوپر لنبات الطماطة

تحضير لقاح الفطر *Trichoderma hrzianum* : حضر

لقاح فطر الـ *Trichoderma* باستخدام بذور الدخن المحلي بعد غسلها جيدا وترطيبها ووضع ٥٠ غرام في بيكر زجاجي ٢٥٠ مل وبعدها تم ترطيب بذور الدخن وتعقيمها بالاتوكليف لمدة ١٥ دقيقة وتركها في المختبر لكي تبرد وتم تلقيح كل دورق بقرص ٠.٥ سم من مستعمرة حديثة للفطر *Trichoderma* ويعمر خمسة ايام سبق وتم تنميتها على وسط بطاطا دكستروز اكار وتم تحضين الاطباق بدرجة حرارة 25 ± 2 لمدة عشرة ايام مراعيًا بذلك رج الدوارق واطافة الماء المتطر المعقم كل يومين لغرض تنشيط الفطر فضلا عن عدم تكاثر البذور وحصول نمو متجانس للفطر وبعد اكتمال النمو اخذ ١ غم من بذور الدخن التي نمي

الاطباق بدرجة حرارة 28 ± 2 سيليزية لمدة يومين وتم حساب عدد المستعمرات وكانت الكثافة العددية لعزلة البكتريا *Bacillus subtilis* 1 ($10^8 \times 10^{-1}$ مستعمرة بكتيريا/ مل) وعزلة البكتريا *Bacillus subtilis* 2 (20×10^{-1} مستعمرة بكتيريا/ مل) وتم استخدام عزلي البكتريا وبواقع ٥ مل/ للأصص سقي للتربة اما معاملة خلط الفطر *Trichoderma hrzianum* مع البكتريا *Bacillus subtilis* بواقع (٥غم + ٥ مل / أصيص) على التوالي وكانت المعاملات كالآتي:

١. الفطر *Alternaria solani* + البكتريا *Bacillus subtilis* 1.
٢. الفطر *Alternaria solani* + البكتريا *Bacillus subtilis* 2.
٣. الفطر *Alternaria solani* + الفطر *Trichoderma hrzianum*.
٤. الفطر *Alternaria solani* + البكتريا *Bacillus subtilis* 1 + البكتريا *Bacillus subtilis* 2.

عليها الفطر *Trichoderma* ونقل إلى انبوبة اختبار تحتوي على ١٠ مل ماء مقطر معقم داخل غرفة العزل ثم اخذ ١ مل لمعرفة عدد ابواغ الفطر وتم خلطت مع وسط PDA المعقم وقبل تصلبه في اطباق بتري واشتملت على ثلاثة مكررات وحضنت بدرجة حرارة 25 ± 2 سيليزية وبعد خمسة ايام حسبت عدد الابواغ وكان متوسط عدد الابواغ للغرام الواحد 65×10^6 بوع/غم وتم استخدام الـ *Trichoderma* وبواقع ٥غم/ للأصص خلطت مع التربة تم الحصول عليه من قسم وقاية النبات / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل

تحضير لقاح البكتريا *Bacillus subtilis*: وزع وسط (NB) في انايب اختبار زجاجية سعتها ١٠ مل وتم تعقيمها بجهاز الاوتوكليف ولمدة ١٥ دقيقة واخذ مسحة من عزلي البكتريا *Bacillus* 1 و *Bacillus* 2 على افراد ولقحت تلك انايب لكل عزلة وحضنت على درجة حرارة 28 ± 2 ولمدة ٤٨ ساعة ثم تم تحضير سلسله من التخفيف لعزلي البكتريا واخذ ١ مل من وسط (NB) واطيف إلى ٩ مل ماء مقطر معقم وحضر من التخفيف الأول فقط ثم وضع ١ مل/ طبق بتري من الوسط (NA) قبل تصلبه مع الرج وبواقع ثلاث مكررات وحضنت

الحنفاجي وآخرون: اختبار كفاءة عزلات من البكتيريا ...

باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer ultraviolet / visible من نوع (CE 0810911) من شركة (UK).

تقدير فعالية الانزيم بولي فينول اوكسيديز (Poly phenol oxidase) حسب طريقة shi وآخرون (٢٠٠٢) وذلك بمتابعة الزيادة الحاصلة في الامتصاص الضوئي الناتج من أكسدة مادة كاتيكول Catechole كركيزة للانزيم عند الطول الموجي ٤٢٠ نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer ultraviolet / visible من نوع (CE 0810911) من شركة (UK).

تقدير فعالية انزيم الكاتاليز (Catalase) حسب طريقة Kato و Shimizu (١٩٨٧) وذلك بمتابعة الزيادة الحاصلة في الامتصاص الضوئي الناتج من أكسدة مادة بيروكسيد الهيدروجين H₂O₂ كركيزة للانزيم عند الطول الموجي ٢٤٠ نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer ultraviolet / visible من نوع (CE 0810911) من شركة (UK).

تم حساب فعالية الانزيم الثلاثة وفق المعادلة الآتية :

٥ . الفطر *Alternaria solani* + البكتريا *Bacillus subtilis* + الفطر *Trichoderma hrzianum*.

٦ . الفطر *Alternaria solani* + البكتريا *Bacillus subtilis* + الفطر *Trichoderma hrzianum*.

٧ . الفطر *Alternaria solani* فقط . (أصيص بدون أي أضافه)

استحاثات المقاومة: اخذ ١ غم من جذور نبات الطماطة والتي عُملت (بعوامل المكافح الحيوي *Bacillus Trichoderma*) بعد غسلها وتطهيرها بالماء الجاري ثم سحقت الجذور مع ٥ مل من داريء الفوسفات ذو الاس الهيدروجيني ٧ في هاون خزفي وحفظت في انابيب اختبار سعة ١٠ مل ثم خضعت الانابيب الحاوية على خليط انسجة الجذور إلى عملية انتباز بسرعة ٣٠٠٠ دورة/ دقيقة وحفظ الجزء الطافي في درجة صفر سيليزية لحين قياس فعالية الانزيمات

تقدير فعالية انزيم البيروكسيديز (Peroxidase) حسب طريقة (Howell وآخرون، ٢٠٠٠) وذلك بمتابعة الزيادة الحاصلة في الامتصاص الضوئي الناتج من أكسدة مادة كوايكول Guaiacol كركيزة للانزيم عند الطول الموجي ٤٢٠ نانوميتر

موجبة لاختبار الكاتاليز وذلك تكوينها فقاعات هوائية نتيجة تصاعد الأوكسجين من تحلل بيروكسيد الهيدروجين كما وظهرت العزلات الثلاثة قدرتها على إنتاج انزيم سايتوكروم اوكسيدينر وذلك نتيجة تغير لون ورقة الترشيح المشبعة بالكاشف إلى اللون البنفسجي وذلك بعد مرور عشرة ثواني أما نتائج اختبارات (IMVIC) وهي اليوريا والاندول والميثيل الاحمر MR وفوكس بروس كور VP إذ اظهرت نتائج هذه الاختبارات تشابه العزلات مع بعض إذ كانت سالبة لاختبار اليوريا وذلك لبقاء لون الوسط أصفر أما اختبار الاندول اظهرت نتيجة الاختبار إذ تكونت حلقة حمراء على سطح الوسط وكانت موجبة لهذا الاختبار وذلك ناتج من تحلل الحامض الاميني الترتوفان وتحوله إلى اندول بعد إضافة كاشف كوفاكس إلى الوسط أما اختبار الميثيل الاحمر كانت نتيجة هذا الاختبار موجبة وذلك لتكون حلقة حمراء اللون على سطح الوسط بعد إضافة كاشف الميثيل الاحمر وكانت سالبة لاختبار فوكس بروس كور وذلك لعدم تغير لون سطح النمو بعد إضافة كاشف البايورنت ولتميز قابلية العزلات على تحلل النشا كما في نتائج الجدول (٢) عند تنميتها على وسط النشا إذ احيط خط النمو لمستعمرة البكتيريا عزلة (٢) بهالة شفافة اللون وذلك دليل على تحلل النشا وتم التأكد من ذلك بعد إضافة كاشف اليود

$$\frac{3 \times \Delta}{\Delta n} = \text{فعالية الانزيم/ دقيقة/ غم نسيج رطب}$$

حيث Δ : التغير في امتصاص الضوء

Δ ن: المدة الزمنية المستغرقة للتغير في الامتصاص .

نفذت التجربة باستخدام التصميم العشوائي الكامل CRD وتضمنت كل معاملة على ثلاثة مكررات واختبرت النتائج بطريقة دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمالية ٠.٠٠٥ .

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص:

تشخيص عزلات البكتيريا: اظهرت مستعمرات البكتيريا على الوسط الغذائي (NA) الصلب منتشرة الشكل ذات حواف غير منتظمة ومسطحة لزجة وذات لون كريمي يميل إلى البني وذات لزوجة وامتاز سطحها املس وناعم وعند اجراء اختبار صبغة كرام Gram stain اظهرت نتائج الفحص المجهرى خلايا العزلات الثلاثة متجمعة وبشكل عصوي مزدوج أو مفرد وبشكل سلاسل وكانت استجابتها موجبة لصبغة كرام والسبورات كانت بشكل اهليجي مع احتوائها على بوع مركزي أو كان بالقرب من المركز ويظهر الجدول (٢) نتائج الاختبار الكيموحيوية كانت

الحنفاجي وآخرون: اختبار كفاءة عزلات من البكتيريا . . .

١٩٨٥) والتأكد من عزلات البكتيريا تعود إلى بكتيريا *Bacillus subtilis* من قبل الاستاذ المساعد الدكتور هيام عادل ابراهيم/كلية العلوم/جامعة. الموصل وبذلك سميت حسب الجدول (١) .

١. *Bacillus subtilis*

٢. *Bacillus subtilis*

٣. *Bacillus subtilis*

٤. *Bacillus subtilis* تم الحصول عليها من الاستاذ المساعد الدكتور رجاء غازي عبد المحسن وتم استخدام العزلة ٢ وسميت بالعزلة *Bacillus subtilis* (١) والعزلة ٤ وسميت بالعزلة *Bacillus subtilis* (٢) في مكافحة الفطر المرض في الظلة البلاستيكية

ولوحظ اصطبغت الاطباق بهالة صفراء اللون حول نمو مستعمرة البكتيريا عزلة (٢) أي أن هذه العزلة تفرز انزيم الاميليز للوسط الخارجي الذي يكسر النشا إلى سكريات بسيطة (كلوكوز) وبالتالي تظهر المنطقة الشفافة الخالية من النشا أما العزلتين (١) و(٣) كانت سالبة لاختبار تحلل النشا وذلك إذ لم تتكون هالة شفافة وتحول لونها بعد إضافة محلول اليود أما اختبار تخمر السكريات (كالكتوز وسكروز ومالتوز وفركتوز) فإن العزلات الثلاثة اعطت نتيجة سالبة لهذا الاختبار وذلك بقاء اللون الاحمر وعدم تحوله إلى الاصفر

وبناءً على شكل مستعمرات البكتيريا ونتائج اختبارات الكيموحيوية وذلك لمطابقة لما ذكره (Collins و Lyne،

الجدول (٢) نتائج اختبارات الكيموحيوية لعزلات البكتيريا

الاختبارات	عزلة (١)	عزلة (٢)	عزلة (٣)
Gram stain	+	+	+
Catalase	+	+	+
Oxidase	+	+	+
Urease	-	-	-
Indole	+	+	+
Citrate	-	-	-
MR	+	+	+
VP	-	-	-
Starch	-	+	-
Catalase	-	-	-
Sucrase	-	-	-
Maltase	-	-	-
Fructase	-	-	-

(+) موجبة للاختبار (-) سالبة للاختبار

عن معاملة خلط البكتريا (١) *Bacillus subtilis* +
 البكتريا (٢) *Bacillus subtilis* في زيادة فعالية انزيم
 البيروكسديز والذي بلغت ٠.٧٢٩ (دقيقة/ غرام وزن رطب)
 وتأتي بعدها معاملة الفطر *T.harzianum* + (٢)
Bacillus subtilis والذي لم تختلف معنوياً عن المعاملة
 السابقة في زيادة فعالية انزيم البيروكسديز والذي بلغت ٠.٦٥٦
 (دقيقة/غرام وزن رطب) واقلها زيادة في فعالية انزيم البيروكسديز
 كانت مع معاملة الفطر *T.harzianum* + البكتريا (١)
Bacillus subtilis والذي بلغت فيها فعالية انزيم

تأثير عوامل المكافحة الحيوية في فعالية انزيمات الاستحاثات
 تأثير عوامل المكافحة الحيوية في فعالية انزيم البيروكسديز: من معدل
 تأثير عامل المكافحة الحيوية نلاحظ من النتائج المبينة في الجدول
 (3) ان معاملة البكتريا (٢) *Bacillus subtilis* ومعاملة
 الفطر *T.harzianum* تفوقت معنوياً على جميع المعاملات
 حيث زادت من فعالية انزيم البيروكسديز والذي بلغت ١.٠٨٢
 و١.١٠٠ (دقيقة/ غرام وزن رطب) تأتي بعدها معاملة البكتريا
 (١) *Bacillus subtilis* والذي بلغت فيها فعالية انزيم
 البيروكسديز ٠.٨٦٦ (دقيقة/ غرام وزن رطب) ولم تختلف معنوياً

الخنفاجي وآخرون: اختبار كفاءة عزلات من البكتيريا . . .

البيروكسديز ٠.٤٥٢ (دقيقة/ غرام وزن رطب) وذلك مقارنة مع
 فعالية انزيم البيروكسديز في معاملة المقارنة الملوثة بالفطر فقط
 والذي بلغت ٠.٠٨١ (دقيقة / غرام وزن رطب).
 ومن معدل تأثير الفترة الزمنية نلاحظ من النتائج المبينة
 في الجدول (3) إلى تفوق معاملة عوامل لمكافحة الحيوية قبل المعاملة
 بالفطر *A.solani* معنويا والذي زادت من فعالية انزيم
 البيروكسديز والذي بلغت ٠.٧٦٣ دقيقة/غرام وزن رطب في حين
 بلغت فعالية انزيم البيروكسديز في معاملة عوامل مكافحة الحيوية
 بعد المعاملة بالفطر *A.solani* ٠.٦٥٥ (دقيقة/ غرام وزن
 رطب).

الجدول (3): تأثير عامل مكافحة الحيوي في فعالية أنزيم البيروكسديز (دقيقة/ غم وزن رطب) للإصابة بالفطر *Alternaria Solani*
 للصنف سوپر لنبات الطماطة

معدل تأثير الفترة الزمنية	عامل مكافحة الحيوي							الفترة الزمنية
	مقارنة	<i>T. harzianum</i> + <i>Bacillus subtilis</i> 2	<i>T. harzianum</i> + <i>Bacillus subtilis</i> 1	<i>Bacillus subtilis</i> 1 + <i>Bacillus subtilis</i> 2	<i>T. harzianum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> 2	<i>Bacillus subtilis</i> 1	
أ ٠.٧٦٣	هـ ٠.٠٨١	ب ٠.٩٢٦	د ٠.٣٨١	ب ٠.٨٤٤	*أ ١.٣٥٨*	*أ ١.٢٨٦*	ج د ٠.٤٦٨	قبل ٣ أيام
ب ٠.٦٥٥	هـ ٠.٠٨١	د ٠.٣٨٦	ج د ٠.٥٢٢	ج ٠.٦١٤	ب ٠.٨٤٢	ب ٠.٨٧٨	أ ١.٢٦٣	بعد ٣ أيام
	هـ ٠.٠٨١	ج ٠.٦٥٦	د ٠.٤٥٢	ب ج ٠.٧٢٩	أ ١.١٠٠	أ ١.٠٨٢	ب ٠.٨٦٦	معدل تأثير عامل المكافحة الحيوي

* الأرقام التي في الجدول تدل على متوسط لثلاثة مكررات .

** الأرقام المتبوعة بأحرف متشابهة تدل على عدم وجود فروقات معنوية بينهما حسب اختبار دنكن متعدد المدى عند مستوى احتمالية ٥% .

Bacillus subtilis (١) + *T.harzianum* البكتريا (١) وذلك بعد المعاملة بالفطر *A.Solani* بثلاثة أيام والذي بلغت فيها فعالية انزيم البيروكسديز ٠.٦١٤ و ٠.٥٢٢ (دقيقة/ غرام وزن رطب) على التوالي واقلها زيادة في فعالية انزيم البيروكسديز كانت مع معاملة خلط الفطر *T.harzianum* + البكتريا (١) *Bacillus subtilis* قبل المعاملة بالفطر *A.solani* بثلاثة أيام ومعاملة خلط الفطر *T.harzianum* + البكتريا (٢) *Bacillus subtilis* بعد المعاملة بالفطر *A.solani* بثلاثة والذي بلغت ٠.٣٨١ و ٠.٣٨٦ دقيقة/ غرام وزن رطب على التوالي وذلك بالمقارنة مع فعالية انزيم البيروكسديز في معاملة المقارنة الملوثة بالفطر والذي بلغت ٠.٠٨١ دقيقة/ غرام وزن رطب.

تأثير عوامل المكافحة الحيوية في زيادة فعالية انزيم البولي فينول اوكسديز: يتبين من النتائج المشار اليها في الجدول (٤) إلى عدم وجود فروقات معنوية بين جميع عوامل المكافحة الحيوية في زيادة فعالية انزيم البولي فينول اوكسديز ونلاحظ ان معاملة خلط الفطر *Bacillus subtilis* (٢) + *T.harzianum* البكتريا (٢) أعطت اعلى زيادة في فعالية انزيم البولي فينول اوكسديز والذي

ومن تأثير التداخل الثنائي بين الفترة الزمنية وبين عوامل المكافحة الحيوية نلاحظ من النتائج المشار اليها في الجدول (3) ان معاملة البكتريا (٢) *Bacillus subtilis* ومعاملة الفطر *T.harzianum* ومعاملتهم قبل المعاملة بالفطر *A.solani* بثلاثة أيام وأيضا معاملة البكتريا (١) *Bacillus subtilis* بعد المعاملة بالفطر *A.solani* بثلاثة أيام تفوقت معنويا على جميع المعاملات في زيادة فعالية انزيم البيروكسديز والذي بلغت ١.٢٨٦ و ١.٣٥٨ و ١.٢٦٣ (دقيقة/غرام وزن رطب) على التوالي وتأتي بعدها معاملة خلط البكتريا (١) *Bacillus subtilis* + البكتريا (٢) *Bacillus subtilis* ومعاملة خلط الفطر *T.harzianum* + البكتريا (٢) *Bacillus subtilis* قبل المعاملة بالفطر *A.Solani* بثلاثة أيام ومعاملة البكتريا (٢) *Bacillus subtilis* ومعاملة الفطر *T.harzianum* بعد المعاملة بالفطر *A.solani* بثلاثة أيام. والذي زادت من فعالية انزيم البيروكسديز وبلغت ٠.٨٤٤ و ٠.٩٢٦ و ٠.٨٧٨ (دقيقة/ غرام وزن رطب) وتأتي بالمرتبة الثالثة من حيث زيادة فعالية انزيم البيروكسديز معاملة خلط البكتريا (١) *Bacillus subtilis* + البكتريا (٢) *Bacillus subtilis* ومعاملة خلط الفطر

الحنفاجي وآخرون: اختبار كفاءة عزلات من البكتيريا . . .

من النتائج المبينة في الجدول (٤) إلى عدم وجود فروقات معنوية بين معاملة عوامل المكافحة الحيوية قبل وبعد المعاملة بالفطر *A.solani* والذي بلغت فيها فعالية انزيم البولي فينول اوكسيداز ٠.٠٩٨ و ٠.٠٦٥ (دقيقة/ غرام وزن رطب) على التوالي.

بلغت ٠.١٤٣ (دقيقة/ غرام وزن رطب) في حين نلاحظ باقي عوامل المكافحة الحيوية لم تختلف عن بعض في زيادة فعالية انزيم البولي فينول اوكسيداز وذلك بالمقارنة مع المعاملة الملوثة بالفطر فقط والذي بلغت فيها فعالية انزيم البولي فينول اوكسيداز ٠.٠٢٨ (دقيقة/ غرام وزن رطب) ومن معدل تأثير الفترة الزمنية نلاحظ

الجدول (4): تأثير عامل المكافحة الحيوي في فعالية أنزيم البولي فينول أو كسيداز (دقيقة/ غم وزن رطب) للإصابة بالفطر *Alternaria solani* للصف سوبر لنبات الطماطة

معدل تأثير الفترة الزمنية	عامل المكافحة الحيوي							الفترة الزمنية
	مقارنة	<i>T. harzianum</i> + <i>Bacillus subtilis</i> 2	<i>T. harzianum</i> + <i>Bacillus subtilis</i> 1	<i>Bacillus subtilis</i> 1 + <i>Bacillus subtilis</i> 2	<i>T. harzianum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> 2	<i>Bacillus subtilis</i> 1	
أ ٠.٠٩٨	أب ٠.٠٢٨	أب ٠.٠٩٨	أب ٠.١٤٤	أب ٠.١١٩	أب ٠.٠٦٠	أب ٠.٠٨٠	أب ٠.١٥٧	قبل ٣ أيام
أ ٠.٠٦٥	أب ٠.٠٢٨	*أ ٠.١٨٩	أب ٠.٠٦٢	أب ٠.٠٣٩	أب ٠.٠٤٤	ب ٠.٠٢١	أب ٠.٠٧٠	بعد ٣ أيام
	ب ٠.٠٢٨	*أ ٠.١٤٣	أب ٠.١٠٣	أب ٠.٠٦٩	أب ٠.٠٥٢	أب ٠.٠٥١	أب ٠.١١٦	معدل تأثير عامل المكافحة الحيوي

* الأرقام التي في الجدول تدل على متوسط لثلاثة مكررات .

** الأرقام المتبوعة بأحرف متشابهة تدل على عدم وجود فروقات معنوية بينهما حسب اختبار دنكن متعدد المدى عند مستوى احتمالية ٥% .

اعلى زيادة في فعالية انزيم الكاليز اذ بلغت ٠.٢٨٤ و ٠.٢٧٩ (دقيقة/ غرام وزن رطب) ولم يختلف معنوياً عن معاملة البكتريا (*Bacillus subtilis* (٢) و معاملة الفطر *T.harzianum* ومعاملة خلط البكتريا (١) *Bacillus subtilis* + البكتريا (٢) *Bacillus subtilis* في زيادة فعالية انزيم الكاليز والذي بلغت ٠.٢١٠ و ٠.٢٢٤ دقيقة/غرام وزن رطب على التوالي واقلها زيادة في فعالية انزيم الكاليز كانت مع معاملة البكتريا (١) *Bacillus subtilis* والذي بلغت ٠.١٥١ دقيقة/ غرام وزن رطب وذلك مقارنة مع فعالية انزيم الكاليز في المعاملة الملوثة بالفطر فقط والذي بلغت ٠.٠٤٥ (دقيقة/ غرام وزن رطب) واما معدل تأثير الفترة الزمنية قد بينت النتائج تفوق معاملة عوامل المكافحة الحيوية قبل المعاملة بالفطر *A.solani* بثلاثة أيام في زيادة فعالية انزيم الكاليز والذي بلغت ٠.٢٥٠ (دقيقة/ غرام وزن رطب) في حين بلغت في معاملة عوامل المكافحة بعد الفطر بثلاثة أيام ٠.١٣٩ (دقيقة/ غرام وزن رطب).

اما تأثير التداخل الثنائي بين الفترة الزمنية وعوامل المكافحة قد بينت نتائج الجدول (4) إلى عدم وجود فروقات معنوية بين جميع المعاملات وبكلا الفترتين قبل وبعد إذ نلاحظ ان معاملة خلط الفطر *T.harzianum* + البكتريا (٢) *Bacillus subtilis* وذلك بمعاملتها بعد المعاملة بالفطر *A.solani* بثلاثة أيام حيث أعطت اعلى زيادة في فعالية انزيم البولي فينول اوكسديز والذي بلغت ٠.١٨٩ (دقيقة / غرام وزن رطب) مقارنة مع فعالية انزيم البولي فينول اوكسديز في المعاملة الملوثة بالفطر فقط والذي بلغت فيها فعالية الانزيم ٠.٠٢٨ (دقيقة/غرام وزن رطب).

تأثير عوامل المكافحة الحيوية في زيادة فعالية انزيم الكاليز : من معدل تأثير عامل المكافحة الحيوية نلاحظ من النتائج المشار اليها في الجدول (٥) انه جميع عوامل المكافحة الحيوية زادت من فعالية انزيم الكاليز حيث أعطت معاملة خلط الفطر *T.harzianum* + البكتريا (١) *Bacillus subtilis* و معاملة خلط الفطر *T.harzianum* + البكتريا (٢) *Bacillus subtilis*

الحنجاعي وآخرون: اختبار كفاءة عزلات من البكتيريا . . .

الجدول (٥): تأثير عامل المكافحة الحيوي في فعالية أنزيم الكتاليز (دقيقة/ غم وزن رطب) للإصابة بالفطر *Alternaria solani*

للصنف سوپر لنبات الطماطة

معدل تأثير الفترة الزمنية	عامل المكافحة الحيوي							الفترة الزمنية
	مقارنة	<i>T. harzianum</i> + <i>Bacillus subtilis</i> 2	<i>T. harzianum</i> + <i>Bacillus subtilis</i> 1	<i>Bacillus</i> + <i>subtilis</i> 1 <i>Bacillus subtilis</i> 2	<i>T. harzianum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> 2	<i>Bacillus subtilis</i> 1	
أ ٠.٢٥٠	هـ ٠.٠٤٥	أ ٠.٣٤٤	أ ٠.٣٤٢	أ ب ٠.٣١٤	أ ب ج د ٠.٢٣٨	أ ب ج ٠.٢٨٥	ب ج د هـ ٠.١٨٢	قبل ٣ أيام
ب ٠.١٣٩	هـ ٠.٠٤٥	أ ب ج د ٠.٢١٥	أ ب ج د ٠.٢٢٦	ج د هـ ٠.١٣٣	أ ب ج د ٠.٢٣٣	ج د هـ ٠.١٣٦	د هـ ٠.١٢١	بعد ٣ أيام
	ج ٠.٠٤٥	أ* ٠.٢٧٩	أ* ٠.٢٨٤	أ ب ٠.٢٢٤	أ ب ٠.٢٣٦	أ ب ٠.٢١٠	ب ٠.١٥١	معدل تأثير عامل المكافحة الحيوي

* الأرقام التي في الجدول تدل على متوسط لثلاثة مكررات .

** الأرقام المتبوعة بأحرف متشابهة تدل على عدم وجود فروقات معنوية بينهما حسب اختبار دنكن متعدد المدى عند مستوى احتمالية

على التوالي ومشابها لها معاملة خلط البكتريا (١) *Bacillus subtilis* + البكتريا (٢) *Bacillus subtilis* ومعاملتها قبل المعاملة بالفطر *A.solani* بثلاثة أيام والذي بلغت فيها فعالية الانزيم ٠.٣١٤ دقيقة/ غرام رطب ولم تختلف هذه المعاملات معنوياً مع جميع معاملات المكافحة الحيوية وبكلا الفترتين قبل وبعد معاملتها بالفطر *A.solani* والذي جميعها زادت من فعالية انزيم الكتاليز وذلك مقارنة مع المعاملة الملوثة بالفطر فقط

ومن تأثير التداخل الثنائي بين الفترة الزمنية وبين عوامل المكافحة الحيوية نلاحظ من النتائج المشار إليها في الجدول (٥) ان معاملة الفطر *T.harzianum* + البكتريا (١) *Bacillus subtilis* و معاملة خلط الفطر *T.harzianum* + البكتريا (٢) *Bacillus subtilis* وذلك بمعاملتها قبل الفطر *A.Solani* بثلاثة أيام حيث أعطت اعلى زيادة في فعالية انزيم الكتاليز والذي بلغت ٠.٣٤٢ و ٠.٣٤٤ دقيقة/ غرام وزن رطب

ثلاثة أنواع من البكتريا *Azotobacter chroococcum* والبكتريا *Bacillus* و *Frateuria auranta* والبكتريا *megaterium* كانت لهذه البكتريا القدرة على زيادة كمية الفينولات الكلية و صبغات التركيب الضوئي والتي بدورها تعمل على تحفيز المقاومة الجهازية وتخفيض تأثير فيروس موزائيك الخيار في نبات البندورة / الطماطم .

الاستنتاجات: يمكن الاستنتاج بأن البكتريا المعزولة من التربة تنوع الى النوع *Bacillus subtilis* كما في الجدول (٢) . وبينت نتائج الجداول (٣,٤,٥) ان استخدام بكتريا *Bacillus subtilis* بشكل مفرد كذلك استخدام الفطر *hrzianum* و *Trichoderma* بشكل مفرد وخطهم مع بعض ومعاملتهم قبل وبعد المعاملة بالفطر *Alternaria solani* بثلاثة أيام رفعت من فعالية انزيمات استحداث المقاومة الجهازية في نبات الطماطم متمثل بأنزيم البيروكسديز والبولي فينول اوكسيديز والكتاليز وافضلها كانت بمعاملة عوامل المكافحة الحيوية قبل المعاملة بالفطر *Alternaria solani* بثلاثة أيام مسبب مرض اللفحة المبكرة وذلك مقارنة مع المعاملة الملوثة بالفطر الممرض فقط والتي

والذي بلغت فيها انزيم الكتاليز ٠.٠٤٥ دقيقة/ غرام وزن رطب . وذكر إبراهيم (٢٠٠٩) قدرة عزلات الفطر *Trichoderma* وأستخدامها بشكل مفرد عملت على استحداث المقاومة الجهازية في نبات الفاصوليا ضد الفطر *R.Solani* وتفوقت العزلات *Thk20* و *T.viride* و *Thk80* و *Thl* ذلك من خلال زيادة فعالية انزيمات الكتاليز والبيروكسديز وبولي فينول وذكر صبر(٢٠١٣) ان معاملة بذور الطماطم من خلال تقعها بالبكتريا *B.subtilis* لمدة ٦٠ دقيقة استحدثت المقاومة الجهازية في النبات ضد الفايروس *cucumber mosaic vims* واعطت اعلى زيادة في فعالية انزيم البيروكسديز اذ بلغت ٨٢.٥٢٣ (دقيقة/ غم وزن رطب) اما تقعها لمدة ١٥ دقيقة بلغت فعالية الانزيم ٦٦.١٢٧ (دقيقة/ غم وزن رطب) تاتي بعدها طريقة تبليل التربة ثم زراعة البذور وذلك مقارنة مع النبات التي عوملت بالفايروس فقط وكما وأشار هاشم (٢٠١٧) ان معاملة نبات البطيخ بالفطر *T.viride* والبكتريا *B.subtilis* بشكل مفرد زادت من فعالية انزيم البيروكسديز اذ بلغت ٨١.٢ و ٨٠.٦ (دقيقة/ غم وزن رطب) على التوالي مقارنة مع المعاملة الملوثة بالفطر فقط اذ بلغت فعالية انزيم البيروكسديز ٣٦.٩ (دقيقة/ غم وزن رطب) كما وذكر الشامي واخرون (٢٠١٧) ان استخدام

الخنفاجي وآخرون: اختبار كفاءة عزلات من البكتيريا . . .

melo L، رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد .

صبر، ليلي صبار (٢٠١٣) تحفيز المقاومة الجهازية في نباتات

cucumber mosaic virus باستخدام خلط من البكتيريا

pseudomonas fluorescens و

Bacillus SP ومستحضر الـ Bion، أطروحة

دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد .

علي وعصام حسن فيصل عبد الرحمن وجيه موسى عيسى .

(٢٠٠٧) . تأثير التغطية بالبلاستيك الزراعي في إصابة

بعض اصناف الطماطة *lycopersicon*

esculentum mill. بمرض

اللثة المبكرة المتسبب عن الفطر *Alternaria*

solani في المنطقة الصحراوية لحافظة البصرة . مجلة

البصرة للعلوم الزراعية ، ٢ (١) ١٣ - ١٣ .

Alkpa, E. P.; B. Jacques.; M. Wqthelet.; R. Paquot.; H. Fnchs.; Z. Budzikiewicz and P. Thonort. (2001). Influence of Culturable condition on lip pepti de condition by *Bacillus subtilis*. Apple. Biochem. Biotechnol. 91 (93): 551-561.

انخفضت فيها فعالية انزيمات استحداث المقاومة الجهازية في نبات الطماطة والتي لم يستخدم فيها عوامل المكافحة الحيوية .

المصادر

إبراهيم، بسام يحيى (٢٠٠٩) . استحداث طرز احيائية من انواع

الفطر *Trichoderma* لتحسين كفاءتها كعوامل

للمكافحة الاحيائية و تحفيز صفات نمو النبات،

أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة والغابات، جامعة

الموصل .

الشامي، رامز محمد وعماد داؤد إسماعيل وياسر علي حماد

(٢٠١٧) تأثير بعض أنواع البكتيريا المحفزة لنمو النبات في

الحتوى الفينولي وصبغات التركيب الضوئي لدى نبات

البندورة/ الطماطم الملقحة بفايروس موزائيك، مجلة

وقاية النبات العربية، ٣٥(٣): ١٣٩-١٤٤ .

هاشم، منير زمان (٢٠١٧) . استحداث المقاومة الجهازية

باستخدام العوامل الاحيائية ضد مرض التعفن الفحامي

المتسبب عن الفطر *Macrophomina*

phaseolina في نبات البطيخ . *Cucumis*

- Gracia-Garza, J. A.; R. D. Reeleder and T. C. Paulitz. (1997).** Degredation of *sclerotia* of sclerotinia *sclerotium* by fungus agnats (Bradysia Coprophila and the biocontrol Fungi *Trichoderma* spp soil. Biol. Biochem. 29: 123-129.
- Handlesmam, J. and E. V. Stabble. (1996).** Biocontrol of soil borne pathogens. The plant cell. 8: 1855-1869.
- Harman. G. E. (2000).** Myths and Dogmas of biocontrol change in pereptions derived from searchan *Trichoderma harzianum* T22. Plant. Dis. Rep. 84 (4): 377-393.
- Howell, C. R.; L. E. Hanson.; R. D. Stipanovic and L. S. Puckhaber. (2000).** Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia Solani* by seed treatment with *Trichoderma Viride*. Phytopath. 90: 248-252.
- Jamil, B. (2007).** Isolation of *Bacillus subtilis* MH-4 from soil and its potential of polypeptidic antibiotic production. PAK. J. Sci. 20 (1): 26-31.
- Kato, M. and S. shimizu (1987).** Chlorophyll metabolism in higher plants. VII chlorophyll degradation in senescing
- Almassi, F.; E. Chisalberti.; M. J. Narbey and K. Sivasithamparam (1991).** New anti biotics from strain of *Trichoderma harzianum*. Nat. Prod. 54: 396-402.
- Athukorala, S.N.;W.G.D. Fernand and K.Y. Rashid. (2009).** Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and Maldi-T. of mass spectrometry. Canda. J. Microboil. 55: 1021-1032.
- Bargabus, R. L.; N. K. Zidack.; J. E. Serwood and B. J. Jacobsen. (2002).** Characterisation of systemic resistance in sugarbeet elicited by anon pathogenic. Phyllosphere-Colonizing *Bacillus mycoides*. Biological cont. Agent. 61: 289-298.
- Collins, C. H.; and p.m. Lune (1985)** Microbiological methods fifth edition chapter 34(genus *Bacillus*) p.p.356-360.
- Cook, R. J. (1994).** Introduction of soil organisms to control root disease In: Pankhurst, C.; B. M. Doube V. V. Gupta and P. Grace (ed). Soil Biotq: Management in sustainable farming system. G. S. East Melbourne, Australia pp: 13-22.

- testing the antagonistics activity of these Fungi. *Phytopath. Anal.* 10 (5): 285-288.
- Sansinenea, E and A. Ortiz. (2011).** Secondary Meta bolites of soil *Bacillus* spp. *Biotenchol.* 33: 1523-1538.
- Shi, C.; y. Dai.; X.Xu.; X. xie and Q.Liu (2002).** The purification of polyphenol oxidase from tobacco protein Experiment and purification 24: 51-55
- Waals, J; E; L. Korsten and B. slippers (2004).** Genetic diversity among *Alternaria solani* from potato in south Africa. *Plant Disease* 88: 959-964.
- Yousefi, H.; N. Sehebani.; M. Mirabolfathy.; L. Fara Vardan and V. Mahdavi (2010).** The effect of Salicylic acid and *Bacillus Subtilis* on cucumber root and stem rot. Caused by *Fusarium oxysporium F. Sp. Radici. Cucumerinum.* Iran. *J. Plant. pathol.* 4 (4): 85-87.
- tobacco leaves; phenolic- depent peroxidative degradation can. *J.Bot.* 65: 729-735.
- Lo, C. T.; E. B. Nelson.; C. K. Hayes and G. E. Harman. (2000).** Ecological Studies of trans formed *Trichoderma hazianum* strain 1295-22 in rizosphere and on the phylloplane of creephng bentgrass. *Phytopath.* 88: 721-728.
- Larito, M. (1998).** Chitinolytic enzymes and their genes pages 73-99- in *Trichoderma and Gliocodium.* Vol. 2 G. E. Harman and C. P. Kubieceak, eds. Taylor and Francis. London.
- Pevalta, I.E; knapp, S and spoonar, D.w (2005).** New species of wild tomatoes (*solanum lycopersicom solanaceae*) from Northern peru. *Sys Bot,* 30: 424-434.
- Pezet, R.; V. Pont and R. Tabacchi. (1999).** Simple analysis of 6-penty-1- α pyrone a major anti fungal metabolite of *Trichoderma* spp useful for