*توظيف القدرات الايضية لبكتريا السيدوموناس في السيطرة الحيوية ضد الممرضات الفطرية لنبات الطماطة

تاريخ الاستلام2015/1/19 تاريخ القبول 2015/3/10

علي عبدالرحيم الناشي
قسم علوم الحياة /كلية التربية/
جامعة القادسية

عقيل شنان الميالي *
قسم علوم الحياة / كلية التربية/
جامعة القادسية

الاميل: Akeel.sh80@yahoo.com

الخلاصة

جمعت 60 عينة من مصادر بيئية مختلفة تضمت ترب ملوثة وغير ملوثة بالمركبات الهايدروكاربونية ومياه البزل ومن مصادر سريريه من مستشفى الديوانية التعليمي للفترة من 28 كانون الثاني 2013 ولغاية 1 شباط 2014. تم الحصول على 16 عزلة من *Pseudomonas aeruginosa* و6 عزلات تعود *Pseudomonas fluorescens* . واختريت 3 عزلات من *P. aerugionsa* و عزلة واحدة من *P.fluorescens* لغرض اختبار قدرتهما الايضة في السيطرة الحيوية اتجاه الفطرين *F.solani* و *A.alternata* المعزولين من نباتات الطماطة المصابة بهذين الفطرين والتي جمعت عيناتها من البيوت البلاستيكية في الديوانية. واظهرت النتائج إن جميع العزلات البكترية كانت محفزة لنمو النبات ، إذ أثرت جميعها في زيادة ارتفاع النبات وطول الجذر وزيادة الوزن الجاف والطري للمجموعين الخضري والجذري وبفارق معنوي ($P<0.05$) عن البذور المعاملة بالفطريات الممرضة فقط. واظهرت *P. aerugionsa* المعزولة من اخماج المجاري البولية و *P.fluorescens* المعزولة من الترب الملوثة بالمركبات الهايدروكاربونية قدرة عالية على حماية نبات الطماطة من الإصابة بالفطريات الممرضة.

كلمات مفتاحية: *Pseudomonas* ، التضاد الحيوي ، الطماطة

Microbiology Classification QR 75-99.5

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

المقدمة Introduction

تمتلك بكتيريا السيدوموناس قدرة عالية على مكافحة العديد من المسببات المرضية الفطرية ففي الآونة الأخيرة اتجهت الدراسات الحديثة نحو إيجاد وسائل بديلة للمكافحة الكيمياوية غير الضارة بالنبات وذات كفاءة عالية في القضاء على المسببات المرضية للنبات ولتلافي الأضرار الجانبية التي تتركها المبيدات الكيمياوية في البيئة وصحة الإنسان ، فضلاً عن ظهور سلالات من المسببات المرضية مقاومة لتأثير بعض المبيدات الكيمياوية (1). تتضمن السيطرة الحيوية استعمال وسائل حياتية في مكافحة الآفات الزراعية ، كاستعمال المستخلصات النباتية أو الكائنات الحية التي تعمل على تخفيض كمية لقاح الكائن الممرض بتقليل كفاءته في النمو والتكاثر بصورة مباشرة أو غير مباشرة وفي الوقت نفسه يكون لها تأثيراً إيجابياً على نمو النبات وتحسين إنتاجه (2) . ولكي يتكامل عمل هذه المبيدات الحيوية في القضاء على العوامل الممرضة يتطلب تحقيق ظروف بيئية ملائمة لنمو وتطور كل من هذه الكائنات والنبات وفي الوقت نفسه مثبطة لنمو لكائن الممرض وفعاليته (3) . لقد أظهرت العديد من أجناس وأنواع البكتيريا الجذرية المحفزة لنمو النبات Promoting plant Growth Rhizospher (PGPR) كفاءة عالية ضد فطريات التربة الممرضة للنبات ومنها مسببات الذبول الوعائي ، فضلاً عن دورها في تحفيز نمو النبات(4) ، ومن الستراتيجيات الحديثة للحصول على وقاية وإنتاج مثاليين والسيطرة على أحياء التربة استعمال المستحضرات الحيوية ومنها Effective Microorganisms (EM) ، إذ تستغل تأثيراته الفعالة ضد المسببات المرضية ، وتحسين نمو النبات وانتاج الثمار إذ تنتج الأحياء المجهرية المكونه له هرمونات مثل Gibberellin, Auxin, Cytockinin وأنزيمات ومضادات حياتية (5) . لذى كان الهدف من الدراسة الحالية هو تقويم القدرة التضادية بين بكتيريا *Pseudomonas* والفطرين الممرضين لنبات الطماطة (*Alternaria alternata* , *Fusarium soloni*) كبديل عن المكافحة الكيمياوية الملوثة للبيئة والتربة.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1- جمع العينات Collection of samples

جمعت العينات التي تخص العزل البكتيري للفترة من 28 كانون الثاني2013 ولغاية 1 شباط 2014 من مناطق مختلفة من مدينة الديوانية شملت الترب المعرضة للتلوث بالمواد الهايدروكاربونية ومن ترب زراعية غير ملوثة بالمواد الهايدروكاربونية وذلك بأخذ 1كغم من التربة في أكياس بلاستيكية معقمة وكذلك جمعت عينات مياه من أحد المبازل في جامعة القادسية حيث جمع لتر من ماء البزل في قنان زجاجية نظيفة ، كما جمعت عينات من أخماج المجاري البولية إذ جمعت عينات البول لأشخاص مصابين بالتهاب المسالك البولية باستخدام مسحات قطنية معقمة Sterilization cotton swabs من مستشفى الديوانية التعليمي ، أما بالنسبة لعينات الفطريات المستخدمة في الدراسة فقد تم جمعها من أحدى مزارع الطماطه في مدينة الديوانية وذلك بأخذ أعضاء نبات الطماطة المصابة في ورق معدني معقم.

2- زرع العينات Cultivation of samples

حُضرت العينات لغرض الزرع الجرثومي حسب طبيعتها ، فنماذج التربة أخذ 10غم من كل نموذج وذوب في 100مل ماء مقطر معقم ثم رج المحلول جيداً ، أما نماذج ماء البزل فأخذ 10مل من العينة وخلط مع 90مل من ماء مقطر معقم مع المزج الجيد ، بعدها لقح الوسط الغذائي الأكار المغذي (Nutrient agar) بطريقة التخطيط بالنموذج المعين (6). في حين عينات الإدرار زرعت على وسط الاكار المغذي أيضاً وبطريقة التخطيط بأستخدام مسحات قطنية Sterilization cotton swabs (7). حضنت جميع العزلات البكتيرية بدرجة 30م° لمدة 24 ساعة.

3- العزل والتشخيص Isolation and identification

1.3.عزل وتشخيص البكتريا

أعيد زرع العزلات البكتيرية غير المشخصة على اكار الماكونكي MacConkeys Agar والوسط الانتخابي لبكتريا السيدوموناس Citrimide Agar بطريقة التخطيط ، وحُضنت الأطباق لمدة (24) ساعة بدرجة حرارة (30) مْ . وشخصت ابتدائيا بدراسة الخصائص المزرعية والمجهرية ، كما اجريت مجموعة من الاختبارات الكيموحية ومنها :

- اختبار الكاتاليز Catalase test ، إختبار إستهلاك السترات Citrate utilization test ، اختبار أحمر المثيل Methyl Red test ، اختبار الفوكس بروسكور Voges-Proskauer test ، اختبار الحركة Motility test اختبار الاوكسديز Oxidase test (6) .

1.1.3. اختبار نظام API 20 System API 20 test

أجري هذا الاختبار للتأكد من دقة تشخيص العزلات البكتيرية وعلى مستوى النوع باستخدام النظام التشخيصي API 20 system المجهز من قبل شركة Biomerieux هو نظام تشخيصي للبكتريا.

2.3.عزل وتشخيص الفطريات Isolation and Identification of fungi

جمعت نباتات الطماطة (صنف Supermarimond) المصابة بالفطريات الممرضة من مزارع البيوت البلاستيكية في مدينة الديوانية لغرض عزل المسببات المرضية فيها حسب الطريقة التي أوردها نخيلات(8) أذ قطعت الأجزاء المصابة من النبات بواسطة سكين حاد، ووضعت هذه القطع النباتية المصابة في محلول هايبوكلورات الصوديوم 10% لمدة 1-2 دقيقة وبعدها غسلت بالماء المقطر المعقم ثم نقلت الى اطباق بتري تحتوي على الوسط الغذائي (PDA) ثم

حضنت بدرجة 25م° لمدة 5 أيام ، وبعد حصول النمو الفطري نُقلت الى مرة اخرى الى اطباق بتري تحوي الوسط (PDA) لاجل الحصول على مزرعة نقية من كل فطر ممرض معزول. بعد عملية عزل الفطريات الممرضة لنبات الطماطة جرت عملية تشخيص هذه الفطريات الى مستوى النوع ، اعتمادا على المظهر الخارجي للمستعمرة (Morphological features) مثل الشكل و اللون و قطر المستعمرة و ارتفاعها و أيضاً اعتمادا على الصفات المجهرية (Microscopic features)مثل شكل و حجم و لون و تركيب الحوامل و الأبواغ و التراكيب الأخرى على وفق الأسس التصنيفية المعتمدة و باستخدام المفاتيح التصنيفية الواردها Midgley وجماعته (9) و De Hoog (10) وقد تم انتخاب نوعين من الفطريات لكثرة ترددها وأهميتها كمسببات مرضية مهمة لأجراء التجارب عليها و هي *Fusariumi solani* و *Alternaria alternate* .

3.3. تلقيح البذور بالبكتريا Seed inoculation with bacteria

عقمت البذور سطحياً بمحلول هايبوكلوريد الصوديوم لمدة ثلاث دقائق ثم غسلت بماء مقطر معقم ثلاث مرات وجففت باستعمال أوراق ترشيح معقمه ، بعدها غمرت بمحلول سكري 10% لضمان التصاق الخلايا البكتيرية بسطح البذور ثم لوثت البذور بوسط نقيع الدماغ السائل الملقح بالعزلات البكتيرية لمدة 15 دقيقة . وبعد معاملة البذور بالبكتريا رفعت من الوسط ووضعت على ورقة ترشيح لتجفيفها لمدة 30 دقيقة (11).

4. تحضير اللقاح الفطري The preparation of the vaccine fungi

حضر لقاح الفطر باستخدام بذور الدخن المحلي *Panicum millaceum L.* المنقعة بالماء لمدة ست ساعات ، بعدها غسلت جيداً لإزالة الأتربة والشوائب العالقة بها ثم جففت بدرجة حرارة المختبر ووزعت في دوارق سعة (250) مل وبمعدل 50غم/دورق ، عقمت بجهاز المؤصدة autoclave ، تركت الدوارق لتبرد بعد ذلك لقحت بأقراص من مستعمرة الفطر النامية على وسط PDA بعمر خمسة أيام على درجة حرارة (25±1) م° مع مراعاة رج الدوارق كل (2-3) أيام لضمان توزيع الفطر على جميع البذور(12).

5. اختبار القدرة الامراضية للفطريات المعزولة Test the Pathogenicity of fungi isolated

جلبت تربة رملية من إحدى مزارع الطماطة في محافظة الديوانية وغسلت جيدا لإزالة الملوحة الزائدة وجففت مع بتموس بنسبة1:3 عقمت التربة بالموصدة تحت درجة حرارة 121مْ وضغط 15 باوند/انج^2 لمدة ساعة واحدة ولمرتين على يومين متتاليين. بعدها أضيف لقاح الفطر *F. solani* والفطر *A. Alternata* الممرضين إلى التربة المعقمة بنسبة 0.5%. وضعت التربة واللقاح داخل كيس سيلوفين ورجت جيداً لأجل توزيع اللقاح بصورة متجانسة في التربة، أما معاملة المقارنة فقد أضيفت بذور الدخن المعقمة فقط وبنسبة 0.5% زرع في كل أصيص 20 بذرة طماطة صنف Supermarimond سقيت باحتراس وتحت سعة حقلية (18-20) % حسبت النسبة المئوية للإنبات بعد مرور عشرة أيام من الزراعة كما تم حساب معدل الوزن الطري والجاف للمجموعين الخضري و الجذري وكذلك ارتفاع النبات بعد أربعة أسابيع من الزراعة (13).

6. اختبار كفاءة العزلات البكتيرية المستخدمة في حماية نبات الطماطة من الاصابة بالفطريات الممرضة

عقمت التربة بجهاز الموصدة تحت ضغط 15 باوند/ انج^2 ودرجة حرارة 121 م° لمرتين وليومين متتالين ثم لوثت بلقاح الفطرين *F. solani* و *A. alternata* المحملين على بذور الدخن المحلي بنسبة 0.5% وزن/وزن حيث وضعت التربة واللقاح في كيس سليفون ورجت جيداً لتجانس اللقاح مع التربة . وزعت التربة الملوثة على اصص بقطر 10 سم وسعة 1 كغم بمعدل ثلاث مكررات مع وجود ثلاث مكررات لتربة معقمة مضاف اليها بذور دخن معقمة وبنفس النسبة . نفذت المعاملات التاليه ثم زرعت البذور صنف سوبرماريموند Supermarimond بمعدل 20 بذرة /اصيص وبثلاث مكررات :

- معاملة عزلة المولدة *P. fluorescens*
- معاملة عزلة المستشفى *P. aeruginosa*
- معاملة عزلة البزل *P. aeruginosa*
- معاملة عزلة التربة *P. aeruginosa*

إذ عوملت بذور الطماطة في جميع المعاملات السابقة بمعدل 10 مل من العالق الجرثومي/ غم بذور حاوي على 9×10^6 خلية /مل لمدة نصف ساعة ثم جففت وزرعت حسب طريقة (14).

- معاملة السيطرة : زرعت بذور الطماطة في تربة ملوثة بلقاح الفطر *F. solani* وتربة ملوثة بلقاح الفطر *A. alternata* .
- معاملة التربة المعقمة : زرعت بذور الطماطة في تربة معقمة .
- قياس نسبة الإنبات وارتفاع النبات والأوزان الطرية والجافة :

حسبت نسبة الإنبات بعد عشرة ايام من الزراعة وذلك وفق المعادلة :

النسبة المئوية للانبات = (عدد البذور النابتة /عدد البذور المزروعة)× 100

حسب ارتفاع النبات بقياس معدل الارتفاع لثلاث نباتات من كل وحدة تجريبية ولكل معاملة وذلك من محل اتصال النبات بالتربة الى القمة النامية للساق الرئيسية عند نهاية التجربة .قطع المجموع الخضري باحتراس بعد اربعة اسابيع من الزراعة من محل اتصاله بالتربة وسجل الوزن الطري ثم جفف بالفرن بدرجة حرارة 70 م ° لمدة 24 ساعة وسجل الوزن الجاف .اخذ المجموع الجذري بحذر بعد اربعة اسابيع من الزراعة وغسل تحت الماء الجاري لازالة الاتربة والأوساخ العالق به ثم جفف بورق ترشيح معقم وسجل

الوزن الطري ثم جفف في الفرن بدرجة حرارة 70 م° لمدة 24 ساعة، وسجل الوزن الجاف .

النتائج والمناقشة Results and Discussion

عزل وتشخيص العزلات البكترية

تم جمع 60 عينة من مصادر بيئية مختلفة (ترب ملوثة بالمركبات الهيدروكاربونية وترب غير ملوثة ومياه البزل ومن مصادر سريرية) . زرعت على أوساط مغذية مختلفة تضمنت الوسط المغذي الصلب ، ووسط أكار الستروميد، نقيت هذه العزلات باستعمال تقنية الزرع الثانوي على وسط الأكار المغذي لعدة مرات للحصول على عزلات مفردة ونقية. وبعد ذلك تم تشخيصها بالاعتماد على الصفات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية جدول (1-1) وتم التأكد من العزلات باستعمال نظام التشخيص Api20 system.

الفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية

شخصت جميع العزلات البكترية في هذه الدراسة اعتماداً على الصفات المزرعية للمستعمرات ، فقد زرعت العزلات على وسط الأكار المغذي ، ووسط اكار الستروميد لكونه وسطاً إنتخابياً لجنس الـ*Pseudomonas* ، ووسط الماكونكي الصلب لكونه وسطاً تفريقياً يسمح بنمو البكتريا السالبة لصبغة كرام ، ظهرت مستعمرات بكتريا الـ*Pseudomonas* على وسط الماكونكي بمظهر مرتفع وحافات مسطحة وشاحبة اللون وعند صبغ الخلايا باستخدام صبغة كرام ظهرت بشكل عصيات سالبة لصبغة كرام ، غير مكونة للأبواغ الداخلية وليس لها محفظة (6).أما على وسط اكار الستروميد فظهرت مستعمرات الـ *Pseudomonas* بلون أخضر مزرق أو أخضر مصفر (15).

جدول (4-2): الفحوصات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية

Citrate utilization	Voges – Proskauer	Methyl red	Motility	Oxidase	Catalase	الاختبارات / البكتريا المعزولة	
+	-	-	+	+	+	***P. aeruginosa***	**1**
+	-	-	+	+	+	***P .flourescens***	**2**

عزل وتشخيص الفطريات الممرضة

ظهرت مستعمرات الفطر *F. solani* كثيفة النمو ذات لون أبيض مع انتاجها صبغات بلون وردي غامق أو بنفسجي فاتح ، ويصل قطر المستعمرة الى 5.4 سم بعد سبعة أيام من الحضن عند درجة حرارة 25±2 م°. وقد بينت نتائج الفحص المجهري إن الفطر *F. solani* يكون غزلاً فطرياً مقسماً ، وتحمل الأبواغ الكونيدية الصغيرة (Microconidia) التي تتميز بكونها بيضوية الشكل أو كلوية وتتكون من خلية أو خليتين ، كما ينتج هذا الفطر نوعاً أخر من الأبواغ هي الأبواغ الكونيدية الكبيرة (Macroconidia) وهي ذات شكل أسطواني ، مستدق النهايتين أو معقوف قليلاً تشبه الهلال ، وهي ذات جدران سميكة مؤلفة من ثلاث الى أربع خلايا ، وتكون هذه الأبواغ على حوامل كونيدية متعددة متفرعة ، وقصيرة ربما تكونت من الحشية الثمرية (Sporodochia)، أما الفطر *A. alternata*فظهرت جميع مستعمراتها ذات لون زيتوني داكن بعد سبعة أيام من الحضن عند درجة حرارة 25±2 م° والغزل الفطري مقسم والحوامل الكونيدية داكنه اللون أما كونيدات الفطر فهي الأخرى داكنة اللون محمولة على الحامل بصورة مفردة أو على هيئة سلاسل غير متفرعة وتتميز الكونيدات بكونها عديدة الخلايا دائرية أو أهليليجية وذات نهايات دائرية ضيقة وحواجز طولية وعرضية ، وهذه الصفات المورفولوجية والمجهرية تطابق الصفات الموجودة في المفتاح التصنيفي للفطريات (16) و (17).

تأثير الفطريات المعزولة في أنبات بذور الطماطة ونمو بادراتها

أظهرت نتائج هذه التجربة تبايناً كبيراً في تأثير الفطريات المعزولة في معظم الصفات المدروسة كالنسبة المئوية لإنبات البذور وارتفاع النبات والأوزان الطرية والجافة للمجموعين الخضري والجذري ، إذ أظهرت نتائج (جدول 1-2 ، 1-3) قدرة الفطريات الممرضة *F. solani* و *A. alternata* على احداث اختزال في النسبة المئوية لأنبات البذور إذ بلغت 36% ، 40% على التوالي واختلفت بفارق معنوي عن معاملة المقارنة (بدون فطر) التي بلغت فيها النسبة المئوية للأنبات 80% . كذلك لوحظ هناك اختزال في طول الساق والوزن الطري والجاف للمجموع الخضري مقارنة بمعاملة المقارنة (بذور ملوثة بالفطر *F. Solani* وبذور ملوثة بالفطر *A. alternata* . بالنسبة للفطر *F. solani* يرجع سبب ذلك الى دخول الفطر داخل النسيج النباتي عن طريق اختراقه للجدران الخلوية بسبب قابلية الفطر الممرض على

افراز الأنزيمات المحللة للسليلوز والبكتين مثل أنزيم Polygalacxonase ، أو عن طريق الجروح التي تسبب تهشم الأنسجة الخارجية للبشرة وبذلك يسهل على الفطر الدخول الى داخل النبات (18).

وينتج عن الدخول الفطري للأنسجة النباتية وتكاثره بداخلها انسداد للأنسجة الوعائية وعرقلة لعملية صعود النسغ الصاعد الى أعلى النبات وبالتالي موت البادرات الصغيرة وذبول النبات ، وكذلك يعود اصفرار الأوراق الى افراز مادة الأثيلين من قبل الفطر خلال الإمراضية (19). كذلك يفرز المسبب المرضي بعض المركبات الايضية السامة التي تعمل على تحليل مكونات الخلايا والمواد المكونة للصفيحة الوسطى والتي تربط الخلايا مع بعضها (20)

أما بالنسبة للفطر *A. alternata* فيستطيع أن يهاجم العديد من الثمار والخضار ومن ضمنها الطماطة ، ويحدث المرض عموماً في أو حول جروح النباتات ، ويمكن أن يصيب نباتات غير مجرحة (21) ، ويعود سبب خفض نسبة الانبات الى انتاج الفطر الممرض بعض السموم مثل Alternariol (AoH) وهذه النتيجة مماثلة لدراسات أخرى ، حيث وجد إن سم (AoH) يعمل على خفض نسبة أنبات الشعير والحنطة وفول الصويا (22). كذلك يفرز الفطر *A. alternata* سم AAL toxin لإصابة نبات الطماطة وهذا السم مشابه لـ (AoH) الذي يتكون من أحادي مثيل الأيثر Monomethyl ether (AME) (23).

من ناحية أخرى تنتج الطماطة بعض المركبات الأيضية لحماية نفسها من الإصابة ببعض الفطريات ومن هذه المركبات مادة tomatin إلا إن فطر *A. alternata* يقوم بتحليل هذه المادة ، وبالتالي إحداث الإصابة (24) .ويفرز الفطر مادة tentoxin التي تسبب اصفرار الأوراق (25) ، فقد أشار(26) الى اختلاف قدرة عزلات الفطر Alternaria على انتاج Alternaric acid كذلك الى اختلاف في نوعية وكمية الحامض المنتج، وبرهن (27) الى إن أنواع الفطر *A. alternata*وأنواع أخرى قادرة على انتاج السمين Alternariol (AoH) و AlternariolMonomethyl ether (AME) في الطماطة ،حيث تسبب السموم تغيرات فسلجية في خلايا العائل وتغير في نفاذية غشاء الخلية وفقد سريع للإلكتروليت (28) . وأشارت نتائج (29) إن الفطر *A. solani* ينتج Alternaric acid بنسبة 0.1 مايكرومول في المرحلة المبكرة للإصابة مما يسبب ضرر بسيط للنبات ثم تزداد كميته وضرره بمرور الوقت. وقد تعود شدة الإصابة لقابلية الفطر الممرض على انتاج السموم والتي تؤثر بدورها على تطور المرض وظهور أعراض الإصابة حيث أكد (30) بأن السموم Altenusin و-3 alternariol hydroxyalternariol Monoethylether أظهرت سمية عالية لخلايا النبات ، وأن الانخفاض الحاصل لنمو النبات بسبب تأثير السموم في منع تخليق واحد أو أكثر من هرمونات النمو مثل (الأوكسينات ، الجبرلينات والسايتوكاينينات) وتتفق هذه النتائج مع (31) الذي أكد إن سموم الفطر *Alternaria* تسبب ذبول وتبقع لبادرات الطماطة.

ويوضح ايضاً جدول(1-2) وجدول (1-3) قدرة العزلات البكترية المستخدمة قيد الدراسة رفع نسبة الإنبات الى 84% عند معاملة البذور بعزلة المولدة *P. fluorescens* وعزلة المستشفى *P. aeruginosa* وكذلك احدثت العزلات البكترية زيادة معنوية في طول الجذر والساق وزيادة في الوزن الطري والجاف للمجموع الخضري والجذري بالنسبة لمعاملة السيطرة بالفطرين الممرضين *F. solani* و *A. alternata*.

بينما اعطت النتائج فروقاً معنوية بين العزلات المستخدمة ، سجل أعلى ارتفاع للنبات 9.9 سم وطول 3.6 سم للجذر عند معاملة البذور بعزلة المستشفى . في حين كان ارتفاع النبات 8.3 سم عند معاملة البذور بعزلة التربة وطول الجذر 2.3 سم عند معاملة البذور بعزلة البزل.

أما بالنسبة للوزن الطري والجاف للمجموع الخضري فكانت أعلى نسبة زيادة عند معاملة البذور بعزلة البزل حيث بلغ الوزن 0.723 غم ، و 0.077 غم بالنسبة للوزن الجاف. أما الجذر فكانت أعلى زيادة للوزن الطري هي 0.074غم. و0.039 غم للوزن الجاف عند معاملة البذور بعزلة المولدة. وفيما يتعلق بالعزلات الجرثومية فقد أثرت جميع العزلات في ارتفاع النبات والجذر وزيادة الوزن الطري للمجموع الخضري والجذري وبفروق معنوية عند مستوى احتمال ($P<0.05$)بالنسبة لمعاملة المقارنة.

جدول (1-2) كفاءة عزلات جنس Pseudomonas في تنشيط كفاءة النمو الخضري ورفع نسبة الانبات

المعاملات	ارتفاع النبات (سم)	الوزن الطري للمجموع الخضري (غم)	الوزن الجاف للمجموع الخضري (غم)	النسبة المؤية للانبات
السيطرة بدون معاملة	b 9.3	a 1.31	a 0.345	%80
معاملة البذوربالفطر*F.solani*	c 5.7	c 0.113	d 0.011	%36
معاملة البذور بالفطر*A.alternata*	c 6.33	c 0.15	d 0.014	%40
معاملة البذور بعزلة المستشفى *P.aeruginosa*	b 9.96	a 1.39	a 0.103	%84
معاملة البذور بعزلة المولدة *P.fluorescena*	b 9.83	a 1.38	a 0.068	%84
معاملة البذور بعزلة التربة *P.aeruginosa*	b8.66	a 1.29	a 0.071	%80
معاملة البذور بعزلة البزل *P.aeruginosa*	b9.2	a 1.26	a 0.077	%80

- الأحرف المتشابهة تشير الى عدم وجود فرق معنوي (P>0.05)
- الأحرف غيرالمتشابهة تشير الى وجود فرق معنوي(P<0.05)

جدول (1-3) كفاءة عزلات جنس Pseudomonas في تنشيط كفاءة النمو الخضري ورفع نسبة الانبات

المعاملات	طول الجذر (سم)	الوزن الطري للمجموع الجذري (غم)	الوزن الجاف للمجموع الجذري (غم)	النسبة المؤية للانبات
السيطرة بدون معاملة	b 3.33	a 0.058	a 0.0116	%80
معاملة البذور بالفطر*F.solani*	c 1.3	c 0.032	d 0.0017	%36
معاملة البذور بالفطر *A.alternata*	c 1.53	c 0.046	d 0.0039	%40
معاملة البذور بعزلة المستشفى *P.aeruginosa*	b 3.66	a 0.053	a 0.012	%84
معاملة البذور بعزلة المولدة *P.fluorescena*	b 3.63	a 0.074	a 0.039	%84
معاملة البذور بعزلة التربة *P.aeruginosa*	b 3.03	a 0.058	a 0.012	%80
معاملة البذور بعزلة البزل*P.aeruginosa*	b 3.11	a 0.059	a 0.029	%80

- الأحرف المتشابهة تشير الى عدم وجود فرق معنوي (P>0.05)
- الأحرف غيرالمتشابهة تشير الى وجود فرق معنوي(P<0.05)

كفاءة العزلات البكترية في حماية الطماطة من الفطريات الممرضة في الحقل

لقد أظهرت نتائج الدراسة إن تثبيط الفطر*F. solani* والفطر *A. alternata* من قبل جراثيم *Pseudomonas* وتقليل شدة المرض وظهور أعراضه على النبات وإمكانية السيطرة عليه ، يبين الجدول (1-4) و(1-5) أعلى نسبة لإنبات البذور الملوثة بالفطر *F. solani* والمعاملة بعزلة المستشفى *P.aeruginosa* 76% وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة (بذور ملوثة بالفطر الممرض) 36% ، أما بالنسبة لعزلة البزل فقد كانت نسبة إنبات البذور 64% مقارنة بمعاملة المقارنة.أبدت جميع العزلات فروق معنوية عند المقارنة بمعاملة المقارنة عند مستوى معنوية (P<0.05) في حين لم تظهر فروق معنوية بين العزلات البكترية الأربعة، حيث أظهرت جميع العزلات زيادة في طول الساق والجذر والوزن الطري والجاف للمجموعين الخضري والجذري ، حيث بلغ طول الساق 7.5 سم عند معاملة البذور الملوثة بالفطر

الممرض *F. solani* بعزلة التربة، أما بالنسبة للجذر فقد كان أكبر قيمة 2.4 سم عند معاملة البذور الملوثة بالفطر الممرض *F. solani* بعزلة المستشفى،أما بالنسبة للوزن الطري والجاف للمجموع الخضري فقد كان قيمة الوزن الطري 0.63 غم والوزن الجاف 0.064 غم عند معاملة البذور الملوثة بالفطر الممرض *F. solani* بعزلة المولدة ، فيما يخص الوزن الطري والجاف للمجموع الجذري فكانت قيمة الوزن الطري 0.057 غم وقيمة الوزن الجاف 0.072 غم عند معاملة البذور الملوثة بالفطر الممرض *F. solani* بعزلة المولدة، وهذا يتفق مع العديد من الباحثين الذين بينوا إمكانية السيطرة على مرض الذبول الفيوزارمي المتسبب عن الفطر *Fusarium oxyporum* بواسطة استعمال سلالات من الزوائف الزنجارية (32) و (33) .

يعود دور بكتريا *Pseudomonas* في زيادة النسبة المئوية للإنبات وزيادة الوزن الطري والجاف للمجموعين الخضري والجذري لقدرتها التنافسية العالية مع الفطر الممرض مما يعطي المجال للتوسع باستعمالها في برامج الإدارة المتكاملة لأمراض النبات ، ومن الصفات التي مكنت هذه البكتريا من السيطرة على الفطريات المرضية هي امتلاكها خاصية النمو السريع في الوسط الغذائي الذي تعيش فيه ومقدرتها التنافسية العالية التي تمتلكها من الاستيطان في منطقة نمو الجذور Rhizoshare واستغلال المصادر الغذائية المتوفرة ، وبذلك أظهرت دوراً فاعلاً في زيادة النسبة المئوية للإنبات وارتفاع

النبات وزيادة الوزن الطري والجاف لقدرتها على زيادة جاهزية العناصر المعدنية وتحفيز نمو النبات (34) . كذلك فضلت بكتريا *Pseudomonas* في المكافحة الحياتية بسبب سرعة انقسامها ومقاومتها لأشعة فوق البنفسجية (35) كما أدت بكتريا *P. fluorescens* الى إيقاف نمو الفطرين *R. solani* و *F. Solani*(36) . ويرجع سبب قدرة بكتريا *P. fluorescens* على تثبيط نمو الفطر الممرض الى انتاجها المضادات الحيوية مثل Lipopeptidocyclic ومركب Amphisin وانتاجها بعض الأنزيمات المحطمة لجدران الخلايا الفطرية مثل أنزيمEndochitinase (37)، وانتاجها لمركبات الـ Sidrophore والتي تقوم بجعل الحديد غير جاهز للفطر وبالتالي تؤدي الى موته وتحليله (38) .وبين (39) أن ألية تثبيط بكتريا *P.fluorescens* الفطر الممرض *R. solani* تعود الى انتاجها انزيمات مثبطة للعديد من الفطريات مثل انزيم Protease ، β-1,3,lucauase , β- 1,4 lucauase , Chitinase وافرازها بعض المضادات الحيوية مثل oomycin ,pyrolntrin , phloroglucinal ، phenazin -1-carboxylic acid , pyroles وكذلك 2,4 diaceytelphloroglucinal (40).

وتوصل Wahyudi وجماعته (41) الى تشخيص 14 عزلة من *Pseudomonas* غير مرضة للنبات تقوم بإنتاج هرمون IAA وتعمل على تحفيز نمو النبات وزيادة أعداد الجذور الجانبية وكذلك لها القدرة على انتاج المواد المخلبية وبعض الانزيمات المحللة التي لها دور كبير في تثبيط نمو الفطر المرض *Fusarium sp.* . ووجد Mubarik وجماعته (42) إن بكتريا *Pseudomonas*الموجودة في المحيط الجذري تلعب دوراً هاماً في نمو النبات وصحته وأن هذا النوع من المجاميع البكترية تمتلك ثلاث خصائص على الأقل تمكنها من تحفيز نمو النبات وهي القدرة على التنافس لاستيطان الجذور وتحفيز نمو النبات وعوامل مكافحة حيوية وتعمل على تحفيز النبات بصورة مباشرة أو غير مباشرة ففي الأولى تتضمن انتاجها هرمون IAA وتحفيزها نمو النبات من خلال أخذ العناصر المغذية وإنتاج المواد المخلبية وإذابة الفوسفات واستطالة الجذور وتحليل المواد السامة أما بصورة غير مباشرة عن طريق انتاجها مواد ايضية مثل المضادات الحيوية ، HCN والتي تعمل على خفض نمو المسببات المرضية (43).أما بالنسبة الى كفاءة بكتريا *P. aeruginosa*في زيادة نسبة الإنبات والوزن الجاف الطري والجاف للمجموعين الخضري والجذري ومنعت نمو الفطر الممرض وهذا يعود الى القدرة التضادية العالية وجاءت هذه النتائج مماثلة لدراسة للباحث Gupta وجماعته (44) حيث سجل قابلية بكتريا *P. aeruginosa* على افراز عدة مضادات حيوية وانزيمات تؤثر في نفاذية غشاء الخلية الفطرية وتعمل على انتفاخ الخيوط الفطرية وانفجارها وتحللها ومن هذه المواد Hydrocyanic acid و Pyocyanin .إن هذا التأثير للبكتريا يأتي من خلال افراز البكتريا *Pseudomonas* لعدة مواد في منطقة المحيط الجذري ومنها Pyoverdin والتي تعمل كمادة ذات تأثير مخلبي للحديد وتجعله غير متيسر للفطريات مما يعمل على كبح نموها ومن خلال انتاجها لمركبات محثه للمقاومة مثل Salicylic acid، Lipopolysc، Pyochelin والتي تعمل على تنشيط أليات الدفاع النباتية وحث النبات على انتاج (الهرمونات النباتية والأوكسينات والسايتوكينينات) (45). ولها تأثير في تحسين نمو ومواصفات النبات من خلال قدرتها على سرعة ذوبانية الفسفور وزيادة جاهزية الحديد وحث النبات على انتاج الهرمونات النباتية ،إضافة الى إن لها القدرة على صنع IAA بعدة طرق في حال توافر الحامض الأميني التربتوفان (46).

جدول (1-4) كفاءة عزلات جنس Pseudomonas في تخفيض شدة اصابة نبات الطماطة بالفطر *F.solani*

المعاملات	طول الساق (سم)	الوزن الطري للمجموع الخضري (غم)	الوزن الجاف للمجموع الخضري (غم)	النسبة المؤية للانبات
السيطرة بالفطر *F.solani*	b 5.7	b 0.113	b 0.011	%36
معاملة الفطر *F.solani* بعزلة المستشفى *P.aeruginosa*	a 7.1	a 0.6	a 0.061	%76
معاملة الفطر *F.solani* بعزلة المولدة *P.fluorescena*	a 7.16	a 0.62	a 0.064	%72
معاملة الفطر *F.solani* بعزلةالتربة *P.aeruginosa*	a 7.53	a 0.62	a 0.060	%68
معاملة الفطر F.*solani* بعزلةالبزل *P.aeruginosa*	a 6.9	a 0.63	a 0.061	%64

- الأحرف المتشابهة تشير الى عدم وجود فرق معنوي (P>0.05)
- الأحرف غيرالمتشابهة تشير الى وجود فرق معنوي(P<0.05)

جدول(1-5) كفاءة عزلات جنس Pseudomonas في تخفيض شدة اصابة نبات الطماطة بالفطر *F.solani*

المعاملات	طول الجذر (سم)	الوزن الطري للمجموع الجذري (غم)	الوزن الجاف للمجموع الجذري (غم)	النسبة المؤية للانبات
السيطرة بالفطر *F.solani*	b 1.3	b 0.032	b 0.0017	%36
معاملة الفطر *F.solani* بعزلة المستشفى *P.aeruginosa*	a 2.46	a 0.056	a 0.0067	%76
معاملة الفطر *F.solani* بعزلة المولدة *P.fluorescena*	a 2.33	a 0.057	a 0.0072	%72
معاملة الفطر *F.solani* بعزلةالتربة *P.aeruginosa*	a 2.5	a 0.051	a 0.0062	%68
معاملة الفطر *F.solani* بعزلة البزل*P.aeruginosa*	a 2.2	a 0.055	a 0.0061	%64

- الأحرف المتشابهة تشير الى عدم وجود فرق معنوي (P>0.05)
- الأحرف غيرالمتشابهة تشير الى وجود فرق معنوي(P<0.05)

أظهرت النتائج جدول (1-6) وجدول (1-7) قدرة العزلات البكترية على زيادة نسبة الإنبات وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة (بذور ملوثة بالفطر *A. alternata*)،ووجد كذلك زيادة في طول الساق والجذر والوزن الجاف والطري للمجموعين الخضري والجذري ،حيث سجلت عزلتا المستشفى والمولدة أعلى نسبة إنبات حيث بلغت 76%في حين تساوت عزلتا التربة والبزل في نسب الانبات حيث بلغت 68% مقارنة بمعاملة المقارنة البالغة 40%. ويبين الجدول (جدول1-6) وجدول(1-5) عدم وجود فروق معنوية بين العزلات البكترية في زيادة طول النبات وزيادة الوزن الجاف والطري للمجموعين الخضري والجذري، حيث بلغ طول الساق 7.4 سم عند معاملة البذور الملوثة بالفطر الممرض

A.alternata بعزلة المستشفى ، أما بالنسبة لطول الجذر فقد كانت أعلى قيمة 2.7 سم عند معاملة البذور الملوثة بالفطر الممرض *A.alternata* بعزلة المولدة، مقارنة بمعاملة السيطرة (بذور ملوثة بالفطر *A. alternata*) التي كان طول الساق فيها 6.3 سم والجذر 1.5 سم ، اما بالنسبة للوزن الطري والجاف للمجموع الخضري فكانت أعلى قيمة 0.8 غم و 0.079 غم على التوالي عند معاملة البذور الملوثة بالفطر الممرض *A.alternata* بعزلة المستشفى ، وبلغ الوزن الطري والجاف للمجموع الجذري 0.071 غم و 0.008 غم على التوالي عند معاملة البذور الملوثة بالفطر الممرض *A.alternata* بعزلة المولدة، ويعود السبب لقدرة بكتريا *Pseudomonas*على استعمار منطقة المحيط البذري إذ تفرز البذور عند تشربها بالماء كميات من الأحماض الأمينية والسكريات والبروتينات مما يؤدي الى زيادة أعدادها في تلك المنطقة ، ويرافق هذه الزيادة في أعداد الخلايا البكترية انتاج العديد من المضادات الحيوية مثل Pyoleoteorin و Phenazine carboxylic (47).

كما أن المضاد Pyoleoteorin يثبط السلسلة التنفسية للفطريات (40). فقد ذكر Ramanujam وجماعته (48) قدرة بكتريا *Pseudomonas*على حماية محصول الطماطة من الإصابة بالفطر A.alternata. فقد وجد Hass و Defago (49) قدرة بكتريا *P. fluorescens* على انتاج المضاد الحيوي 2,4 diaceytelphloroglucinal الذي بدوره يحفز جذور النبات على افراز كمية كبيرة من الأحماض الأمينية ، واستفادة البكتريا من هذه الأحماض بوصفها مصدراً جيداً للكاربون والنتروجين.

كذلك تعمل بكتريا *Pseudomonas* على منافسة المسبب المرضي على المكان والغذاء وابعادها عن أسطح الجذور التي تمثل البيئة الملائمة لها أو ربما يرجع التأثير الى دور البكتريا على استحثاث المقاومة الجهازية لإنتاج مواد كيميائية ذات فعل مثبط أو قاتل للمسببات المرضية للنبات (50).اتفقت هذه النتائج مع ما أشارت إليه دراسات بخصوص كفاءة هذه الأحياء التضادية في حماية عوائل نباتية مختلفة مثل الطماطة والحنطة والخيار من الإصابة بفطر *R. solani*(51).

كما اتفقت مع ما توصل إليه الجميلي وجماعته (52) الى كفاءة *P. fluorescens* في مقاومة مرض تعفن وموت بادرات الخيار وانعكاس ذلك إيجابياً في زيادة الأوزان الجافة للنباتات النامية، كذلك تنتج الأحياء المجهرية المستخدمة في السيطرة الحيوية العديد من الهرمونات مثل Gibberellin , Auxin, Cytockinin وانزيمات وفيتامينات ومضادات حياتية (53). إضافة الى قدرتها على زيادة جاهزية النتروجين والفسفور والعناصر الأخرى في التربة للنبات (54) ، وفي دراسة أخرى مماثلة فقد أشار Sharafzadeh(55) الى إن استخدام بكتريا Promoting growth plant Rhizoshere (PGPR) يعمل على تحسين نمو الجذور وتحسين عملية امتصاص الماء والعناصر والمغذيات من التربة ، إضافة الى زيادة معنوية للأوزان الرطبة والجافة للمجموعين الخضري والجذري للطماطة وكذلك محتوى النبات من عناصر K,P.N.

وبين Castro وجماعته (56) إن بكتريا PGPR لها تأثير في تحسين نمو ومواصفات النبات من خلال قدرة هذه البكتريا على تثبيت النتروجين وزيادة سرعة ذوبانية الفسفور وزيادة جاهزية الحديد وحث النبات على انتاج الهرمونات النباتية إضافة الى توفير الحماية للنبات في منطقة Rhizoshere ضد الأنواع الفطرية المرضية من خلال أنزيمات تعمل بالتضاد مع الفطريات.

جدول(1-6) كفاءة عزلات جنس Pseudomonas في تخفيف شدة اصابة نبات الطماطة بالفطر *A.alternata*

المعاملات	طول الساق (سم)	الوزن الطري للمجموع الخضري (غم)	الوزن الجاف للمجموع الخضري (غم)	النسبة المؤية للانبات
السيطرة بالفطر *A.alternata*	b 6.33	b 0.15	b 0.014	%40
معاملة الفطر *A.alternata* بعزلة المستشفى *P.aeruginosa*	a 7.43	a 0.8	a 0.793	%76
معاملة الفطر *A.alternata* بعزلة المولدة*P.fluorescena*	a 7.5	a 0.78	a 0.077	%76
معاملة الفطر *A.alternata* بعزلة التربة*P.aeruginosa*	a 7.33	a 0.616	a 0.0723	%68
معاملة الفطر *A.alternata* بعزلة البزل*P.aeruginosa*	a 7.3	a 0.693	a 0.069	%68

- الأحرف المتشابهة تشير الى عدم وجود فرق معنوي ($P>0.05$)
- الأحرف غيرالمتشابهة تشير الى وجود فرق معنوي($P<0.05$)

جدول(1-7) كفاءة عزلات جنس Pseudomonas في تخفيف شدة اصابة نبات الطماطة بالفطر *A.alternata*

المعاملة	طول الجذر (سم)	الوزن الطري للمجموع الجذري (غم)	الوزن الجاف للمجموع الجذري (غم)	النسبة المؤية للانبات
السيطرة بالفطر *A.alternata*	b 1.53	b 0.046	b 0.0018	%40
معاملة الفطر *A.alternata* بعزلة المستشفى *P.aeruginosa*	a 2.36	a 0.0703	a 0.0079	%76
معاملة الفطر *A.alternata* بعزلة المولدة *P.fluorescena*	a 2.76	a 0.0716	a 0.008	%76
معاملة الفطر *A.alternata* بعزلة التربة *P.aeruginosa*	a 2.5	a 0.058	a 0.0065	%68
معاملة الفطر *A.alternata* بعزلة البزل *P.aeruginosa*	a 2.6	a 0.061	a 0.0067	%68

- الأحرف المتشابهة تشير الى عدم وجود فرق معنوي ($P>0.05$)
- الأحرف غيرالمتشابهة تشير الى وجود فرق معنوي($P<0.05$)

وتعود قدرة بكتريا *Pseudomonas* الى تثبيط نمو الفطريات الممرضة الى انتاجها العديد من المركبات مثل Phenazyne,Pyluteorin, Pyrolintrin , Pyoverdin Pyochelin , 2,4 diaceytelphloroglucinal, حيث تعمل هذه المركبات على تثبيط نمو الكائن الممرض، كذلك تنتج العديد من الأنزيمات مثل , β glucanase , Protease chitinase (57).

وكذلك تتفق هذه النتائج مع Moradi وجماعته (58) الذي اكد قدرة Pseudomonas على افراز انزيم chitinase و Laminarinase التي لها القدرة على تحليل الغزل الفطري. ايضاً توافقت النتائج مع ما ذكره الوائلي (59) في تأثير بكتريا *P.fluorescens* بشكل قوي على الفطر *F. solani* المسبب لمرض سقوط البادرات على الطماطة إذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط (72%) وقد يعود السبب في قدرة البكتريا في تثبيط الفطر الممرض الى قابليتها على انتاج المضادات الحيوية مثل Pyluteorin و 2,4 diaceytelphloroglucinal التي تعمل تثبيط نمو الفطر(60). كذلك تنتج بكتريا *Pseudomonas* مادة Lipopeptidocyclic ومركب Amphisin وانزيم Endochitinase الذي يقوم بتحطيم جدران الخلايا الفطرية (37) ، وانتاجها المركبات الـ Siderophore التي تجعل الحيد غير جاهز للفطر الممرض وبالتالي يؤدي الى موته وتحلله (38). وجاءت هذه النتيجة مطابقة لنتائج العديد من الدراسات التي أثبتت كفاءة استخدام عزلات من بكتريا *P. fluorescens* على الوسط الزرعي PDA (61). وقد يرجع السبب في التثبيط الى التنافس الحاصل على بعض المغذيات بين الجراثيم والفطر أو قد يعود الى التشابه في نمط استغلال المغذيات بين الجراثيم والفطر (62) .

إن عدم وجود أتصال طبيعي بين البكتريا والفطر ووجود هالة في منطقة الالتقاء بينها التي تعني وجود افرازات سامة للبكتريا تطرحها في الوسط الغذائي لقتل الفطر الممرض، وذلك لأن البكتريا تقوم بإفراز مجموعة من المواد antifunfalmetablites مثل Pyoverdin Pseudobactin, التي لها القابلية على التأثير في أيون الحديديك Fe^{+3} الذي له القابلية على تكوين مركب معقد مع أيون الحديديك(Ferripyoverdin) الي يتفاعل مع الغلاف الخارجي للفطر ويمنع انتقال أيون الحديد عن طريق siderophore (49) و(63).ومن ناحية أخرى لوحظ تغير في لون الغزل الفطري Mycelia عند الالتقاء بالبكتريا وهذا يعزى الى تسرب السايتوبلازم للغزل الفطري وتشوه عند الأطراف ويمكن أن تحاط منطقة الالتقاء البكتريا بالفطر باللون الأخضر الغامق أو افرازها لبعض المركبات المتطايرة مثل (HCN) (41).

وقد وجد إن Pyrrolntrin فعال ضد الفطريات الممرضة خاصة *Fusarium spp.* وفطريات أخرى ممرضة للنبات واستخدم بوصفه مركباً يدخل في تطوير المبيد الفطري الزراعي Phenylpyrrole (64). وتوصل Srivastava و Shalin (65) الى إمكانية استخدام رواشح عزلات بكتريا *Pseudomonas* بوصفها عامل كفوء في المكافحة الحيوية لبعض الفطريات الممرضة للنبات مثل *Fusarium spp.* ، *Alternaria spp.*مما أدى الى تثبيط نمو الفطريات مختبرياً. وفي دراسة للباحث Sivasakth(66) أشار الى قدرة بكتريا *P. fluorescens* و *Bacillus sutillus* في السيطرة الحيويةعلى الأمراض النباتية من خلال افرازها بعض الأنزيمات المحللة والمضادات الحيوية مثل subtilin, bactitracin , bacillin , bacillomycen التي تثبط الفطريات الممرضة وهذه النتائج مماثلة لدراسة للباحث (67). وأشار Manikandan وجماعته (68) الى قدرة بكتريا Pseudomonas للسيطرة الحيوية وتثبيط بعض المراض النباتية بعدة أمكانيات منها انتاج السموم

والمستحلبات الحياتية والانزيمات المحللة والتنافس على المغذيات إضافة الى تحفيز المقاومة الجهازية للنبات (69).

وقد يكون بسبب قدرة بكتريا *Pseudomonas*على منع نمو الفطر من خلال افرازها الإنزيمات الحالة لجدار الخلية الفطرية وانتاجها لمركبات السايدروفور الخالبة للحديد وبلك تمنع الفطر من الحصول على عنصر الحديد (70) و(71). وسجل Jataraf وجماعته (72) استخدام بكتريا *P. fluorescens* ChAo في تحفيز نمو البذور والسيطرة على الفطر *الممرض F. oxyporum sp. Lycopersici*

المصادر

1-Alemu, F. and Alemu, T. (2013). Antifungal activity of secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* isolates as a biocontrol agent of chocolate spot disease (*Botrytis fabae*) of faba bean in Ethiopia. African Journal of Microbiology Research. Vol. 7(47), pp. 5364-5373.

2-Antoun ,H. and Kloepper, J.W. (2001). Plant growth promoting rhizo bacteria. In: Brenner S and Miller JH (eds) Encyclopedia of Genetics. Academic, New York, pp 1477-1480.

3-Harman, G. E., Howell, C. R., Viteba, A., Chet,I. and Lorito, M.(2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews, Microbiology 2:43-66.

4- Berger, S. ; Papadopoulo, S. M. ; Schreiber, U. ; . Kaiser, W. and T. Roitsch, (2004). Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato.Physiologia Plantarum, 122: 419–428.

5-Higa, T.(2000). What is EM technology ?. EM world Journal 1 :1-6.

6-MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Williams and Wilkins. Baltimore. USA.

7-Shanmugam, V. ; Kanoujia, N. (2011). Biological management of vascular wiltof tomatocased by fusarium oxysporum f.sp.lycopersici by plantgrowth promoting rhizobacterial mixture Biological control ., Vol. 57:85-93.

8- نخيلات، عبد العزيز مجيد .(1986). امراض النبات العملي، كلية الزراعة، جامعة البصرة ، مطبعة جامعة البصرة.

9- Midgley,G. ; Clayton,Y.M. and Hay,R.J. (1997) . Diagnosis in colour medical mycology . Mosby – Wolfe , an imprint of mosby international , Spain 155 p.

10-De Hoog,g.s.j.guarro,j.gene,and,m.j.figueras. (2000).Atlas of clinicial fungi,2nd, vol.1.centraabureeau voor schimmelculturees ,Utrecht,the Netherlands.

11-Gravel,V.;Martinez,C.;Antoun,H. and Tweddell,R.J.(2005).Antagonist micro-organisms with the ability to control Pythium damping –off of tomato seeds in rock wool .Biocontrol(50):771-786.

12-Dewan , M.M. and Sivasithamparam, K. (1989) . Occurrence of species of *Aspergillus* and *pencillium* in root of wheat and ray. grass and their effect on root caused by *Gammannomyces graminis var tritici,* Aust. J. Bot.36:701-710 .

13- Dewan, M. M. (1989). Identity and frequency of occurrence of fungi in root of wheat and rye grass and their effect on take –all and hot growth .Ph.D. thesis Univ. west Australia ,210-pp.

14-Ardebili,Z.O.; Ardebili,N.O.and Hamdi,S.M.M.H.(2011). Physiological effects of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants and its possible impact on *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici.* AJCS 5(12):1631-1638.

15-Mathiyazhagan , N. (2011).Amplification of biosurfactant producing gene (rhlB) from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from oil contaminated soil. Int. J. Pharma. Bio. Sci., Vol. 2(1):497-504.

16-Thomma, B.P.H.J.(2003). Pathogen profile , *Alternaria* spp. : from general saprophyte to specific parasite . molecular plant pathol. 4(4) : 225 – 236 .

17-Seifert , K . (1996) . Fus Key ، *Fusarium* interactive Key Agricutare and Agri-Food Canda.

18-Agrios , G . N .(2005) . Plant pathology . 5th ed . Academic press . PP.a52.

19- Gupta, V. K. ; Misra, A. K. ; Gupta ,A.; Pandey , B. K. and Gaur, R. K. (2010). 1Rapd PCR of trichoderma isolates and in vitro antagonism against Fusarium wilt pathogens of

calcium-dependent protein kinase in potato plants. Genetics and Molecular Research 11 (3): 2381-2389 .

30- De Souza, G. D. ; Mithfer, A. ; Daolio, C. ; Schneider, B. and RodriguesFilho, E. (2013). Identification of *Alternaria alternate* Mycotoxins by LC-SPE-NMR and Their Cytotoxic Effects to Soybean (Glycine max) Cell Suspension Culture. Molecules ISSN. 1420-3049.

31-Maiero, M., Bean, G.A., and Ng, T.J.1991. Toxin production by *Alternaria solani* and its related phytotoxicity to tomato breeding lines . Phytopatology . 81: 1030-1033.

32-Brimner, T.A. and G.J. Boland.(2003). A review of the non-target effect of fungi used to biologically control plant diseases. Agriculture, Ecosystem and environment100., 3-16.

33-Ahn, P.; Lee,S. and Suh,S.(2007). Rhizobacteria-Induced Priming in Arabidopsis Is Dependent on Ethylene, Jasmonic Acid, and NPR1. MPMI . 20(7): 759–768.

34-Van Dijk, K., and E.B.Nelson.(2000). Fatty acid competition as a mechanism by which Enterobacter cloacae suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. Appl. Environ.Microbiol. 66:5340–5347.

35- Ding, Z.; Zhang, J. ; Z. ; Chen, Z. ; Hang, D. and Li, J. (2001). Some biological characteristical genetically engineered insecticidal *Pseudomonas fluorescens.* Wei. Sheng. Wu. Xue. Bao., Vol. 41:3-8.

36-Yangui, T.; Rhouma ,A.; Triki, M.A. and J. Bouzid. (2008). Control damping of pepper caused by Rhizoctonia solani and Fusarium solani using olive mill waste water and some of its indigenous bacterial strans crop protection (Guildford , Surrey) 27 (2): 189-197.

37-Andersen, J.B.; Koch, B. ; Nielsen; T.H.; Sorensen;D.; Hansen; M.; Nybroe, O; Christopheren,C.J.Soren,C.;Molin,S. and Gvskove,M. (2003) .Surface motility inpseudomonas sp. Dss73 required for sfficient biological containment of root –pathogenic microfungi Rhizoctonia solani and Pythium ultimum. Microbiology.149: 37 – 46.

38-Kazempour, M.N. (2004). Biological control of Rhizoctonia solani the caused agent ofrice psidium guajava . J. of Plant Protection Res., Vol. 50 (3):557-562.

20- Mali, G. V. and M. G. Bodhankar.(2009). Antifungal and Phytohormone production potential of *Azotobacter chroococcum* isolates from groundnut (*Arachis hypogea*) Rhizosphere. Asian J. Exp. Sci., Vol. 23(1):293-297.

21-Schwartz , H.F. and Gent , D.H. (2007) . Eggplant , Pepper ,andTomato ,Disease , Black Mold . High Plains IPM Guide , a cooperative effort of theUniversity of Wyoming . University of Nebraska , Colorado State Universityand Montana State University . Categories .

22-Hassan, M.E.M. , Abd El-Rahman, S.S. , El-Abbasi, I.H. and Mikhail,M.S. (2007). Changes in Peroxidase Activity Due to Resistance Induced Against Faba Bean Chocolate Spot Disease.Egypt. J. Phytopathol. 35: 35-48 .

23-Graf, E.; Schmidt-Heydt, M.;and Geisen, R. (2012). HOG MAP kinase regulation of alternariol biosynthesis in Alternaria International Journal of Food Microbiology, 157,353–359.

24-Arie, T.; Takahashi, H.; Kodama, M. and Teraoka, T. (2007). Tomato as a model for plant-pathogen interactions. Plant Biotechnology, 24,135–147

25-El-Gali, Z.I.(2014). *Alternaria alternata* Isolated From Lemons (*Citrus lemon*) in Libya. European Journal of Academic Essays 1(9): 20-23.

26-Kheder,A.A.;Akagi,Y.;Takao,K.;Akamatsu, H.and Kodama,M.(2012).Fungal growth and in planta distribution of host-specific AA-Ltoxic in tomato plants infected with the tomato pathotype of Alternaria alternate.Mycotoxins,Vol.62;7-12.

27-Da motta, S. and Lucia, M.V.S.(2000) . A method for the determination of two *Alternaria* toxins, Alternariol and Alternariol monomethyl ether in tomato products. Brazilian Journal of Microbiology.31:315-320.

28-Otani, H.(2000). Host recognition by plant pathogens and role of hostspecific toxins. J. Gen. Plant Pathol. 66: 278-280.

29- Hassan,A. Okuta; T. Kato, M. Hatsugai, N.; Sano, Y.; Okazaki, K.; Doullah M.A. and Ishimori, M.M.(2012). Alternaric acid stimulates phosphorylation of His-tagged RiCDPK2, a

inbiocontrol of Plant Disease. Can. J. Plant Pathol. 25 : 5 - 9 .

48-Ramanujam,J.R.; Kulothungan,S.;, Anitha,S. and.Deepa ,K.(2011)A Study on Compatibility of *Pseudomonas fluorescenes* L. and *Parthenium hysterophorus* L. as a Biocontrol agent to leaf spot by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopercisi* in Tomato South As. J.Biol.Sci. 1(2): 71 – 86.

49-Haas, D. and Defago, G. (2005). Biological control of soil–borne pathogens by fluorescent Pseuedomonas. Nature, Reviews Microbiology, 3(4): 30-319.

50-حسان ، ألاء خضير . (2005). تقويم فاعلية بعض عوامل الاستحثاث والمبيدات في حماية نبات الخيار من الأصابة بالفطر *P. phanidermatum* . رسالة ماجستير . كلية الزراعة ، جامعة بغداد.

51-الركابي، فراس علي أحمد (2009). تأثير مستخلصات النمو الخضري لبعض الأدغال على الفطريات المرضية لجذور الطماطة وفطر المقاومة الأحيائية Trichoderma harizanum Rafi . رسالة ماجستير ، كلية الزراعة ،جامعة الكوفة.

52-الجميلي، سامي عبد الرضا علي وثامر خضير مرزة وألأء عبد علي الخفاف .(2007). تقييم المبيدين الحيويين فلوراميل والباسلين في السيطرة على مرض تعفن وموت البادرات المتسبب عن الفطر Pythium *phanideratum* لنبات الخيار ، في المشتل . مجلة جامعة كربلاء ،5(4)، 296-302.

53-Mckellar , M.E and E.B. Nelson. (.2003). Compost-induced suppression of pythium damping off is mediated by fatty acid-metaboilzing seed colonizing microbial communities .Applied Environ. Microbial. 69:425-460.

54-Hari,R. and Singh, Pal.(2012).plant growth promoting rhizobacteria in plant productivity and protection.Int. journal of jaipur national univ.vol:1 , issue 2,p: 132- 140.

55-Shahram, S. (2012). Effects of PGPR on growth and nutrient uptake of tomato. International Journal of Advances in Engineering and Technology. Vol. 2, Issue 1,pp. 27-31.

56-Castro, R.O; H.A.C. Cornejo; L.M. Rodriguez; J.L.Bucio .(2009). The role of microbial signals in plant growth and development. Plant Signal Behav 4(8):701–712.

sheath blight by antagonistic bacteria in greenhouse and field condition.Plant pathology Journal 3 (2) : 88-96.

39-Saad, M.M. (2006). Destruction of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*ca using Tomato root- rotby *Pseudomonas fluorescens* Lytic enzymes. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 2(6) 274-281.

40-Ligon, J. M.; Hill, D. S.; Hammer, P. E.; Torkewitz, N. R. and Van Pee , K. H. (2000). Natural Products with antifungal activity from *Pseudomonas* Biocontrol bacteria .Pest Many Sci., 56: 688-695.

41-Wahyudi, A.T.; Astui, R.I.; Giyanto, (2011). Screening *Pseudomonas* spp. Isolated from rhizosphere of soybean plant as plant growth promoter and biocontrol agent. *Am. J.Agric. Biol. Sci*., **6**(1), 134-141.

42-Mubarik, N.R.; Mahagiani, A.; Anindyaputri, S.; Santoso S.; Rusmana, I. (2010).Chitinolytic bacteria isolated from chili rhizosphere: chitinase characterization andits application as biocontrol for whitefly (*Bemisia Tabacci Genn*.). *Am. J. Agric.Biol. Sci.*, **5**, 430- 435.

43-Siddiqui, Z.A. (2006). "PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens". In Siddiqui, Z.A. (ed): PGPR: Biocontrol and Biofertilization. pp. 111- 142, Springer,the Netherlands,.

44-Gupta,C.P.; Sharma, A.; Dubey R.and Maheshwari D. (1999).*Pseudomonasaeruginosa* as a strong antagonist of *Macrophomina phaseolina* and*Fusarium oxysporum. Cytobios*, 99:183-189.

45- Maji,S. and Chakrabartty, P. K.(2014). Biocontrol of bacterial wilt of tomato caused by Ralstonia solanacearum by isolates of plangrowth promoting rhizobacteria. AJCS 8(2):208-214.

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

47-Bakker , P. A. H. M. , Ran , L. X. , Pieterse , C. M. J. and Vanloon , L.C. . 2003. Understanding the involvement of rhizobacteria mediated induction of systemic resistance

66- Sivasakthi, S. ; Usharani, G. and Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*; a review. *Afr. J. of Agricultural Res.,* Vol. 9(16): 1265-1277.

67-Karkachi, N.E.; Gharbi, S.; Kihal, M. and Henni, J.E. (2010). Biological Control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*isolated from algerian tomato by *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*,*Serratiamarcescens* and *Trichodermaharzianum, Research Journal of Agronomy* 4(2) 31-34.

68-Manikandan, R.; Saravanakumar, D.; Rajendran, L.; Raguchander, T. and Samiyappan, R. (2010). Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium*wilt of tomato. *Biological Control* 54(2) 83-89.

69-Erdogan, O. and Benlioglu ,K. (2010). Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent Pseudomonas spp. under field conditions. *Biological Control* 53 39–45.

70-Mansoori, M.; Heydari, A.; Hassanzadeh, N.;Rezaee, S. and Naraghi, L. (2013). Evaluation ofPseudomonas and Bacillus bacterial antagonists for biological control of Cotton Verticilium wilt disease.*Journal of Plant Protection Research* 53(2).

71-Kim, H.S.; Sang, M.K.; Jeun, Y.C.; Hwang, B.K. and Kim, K.D. (2008). Sequential selection and efficacy of antagonistic rhizobacteria for controlling Phytophthora blight of pepper. *Crop Protection* 27(3–5) 436– 443.

72-Jataraf J., Radhakrim N.V., Hannk P., Sakoof R. 2005. Biocontrol of tomato damping-off caused by Pythium aphanidermatum.Biocontrol 15: 55–65.

57-Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clément, C.; Barka, E.A.(2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. Appl. Environ.Microbiol. 71: 4951-4959.

58-Moradi H.; Bahramnejad, B.; Amini, J.; Siosemardeh, A.,and HajiAllahverdipoor ,A. (2012).Plant omicsJ., 5(2),68-74.

59-الوائلي،ضياء سالم علي(2004).دراسة مرض موت بادرات الطماطاومكافحتها المتكاملة في مزارع الزبير وسفوان في البصرة،اطروحة دكتوراة،كلية العلوم،جامعة البصرة.

60- Werra , P. D. ; Huser , A. ; Baehler , E. ; Keel , C. and Maurhofer , M. (2006). Using flow cytometry for in situ monitoring of antimicrobial *Pseudomonas fluorescens* CAHO . IOBC / Wprs Bulletin . Vol. 29 : 1-16 .

61-عبد المحسن،رجاء غازي،الحميري،ياسر ناصر.(2014).بعض اوجه التكامل في مكافحة مرض اللفحة المبكرة على نباتات الطماطة .مجلة جامعة كربلاء العلمية .74-67:(1)12.

62-Ellis,R.J.; Timnes– Wilson,T.M.;Beringer, J.E.; Rhodes,D. ; Renwick,A.; Stevenson, L. and. Bailey. M.J .(199). Ecological basis forbiocontrol of damping - offdisease by Pseudomonas fluorescens 54/96. J. Appli. Microbiol., 87 : 454 – 463.

63- Loper, J. E. (2005). "Genomic Sequence of the Biological Control Agent Pseudomonas Fluorescens Pf-5." Methyl Bromide Alternatives and Emissions ResearchConference Proceedings. 113-122.

64-Reddy, K.; choudary, K.A. and Reddy, M.S.(2007). Antifungal Metabolites of *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Rhizosphere of Rice Crop. J. Mycol Pl Pathol 37(2):1-5.

65-Srivastava, R.; Shalini, K. (2009). Antifungal activity of *Pseudomonas fluorescens* againstdifferent plant pathogenic fungi. Intern. *J. Microbiol*., **7**(2).

Employ metabolic capabilities of Pseudomonas in bio-control*

Accepted :10/3/2015 Receved :19/1/2015

Akeel Shannan Al-maili* **Ali Abed Raheem AL-Nashe**
Collage of Pharm. **Dept. Biol./ College of Edu.**
Al-Qadisiya Univ. **Al-Qadisiya Univ.**
Emil: Akeel.sh80@yahoo.com

Abstract

samples collected from different environmental sources included soils contaminated and Sixty non-contaminated vehicles hydrocarbon and water drainage and sources of clinical from Diwaniyah Educational Hospital, for the period from January 28/ 2013 until February 1/ 2014. Sixteen isolates were obtained *Pseudomonas aeruginosa* and 6 isolates belonging *Pseudomonas fluorescens*, and were selected from *P. aerugionsa* and isolate of *P.fluorescens* for the purpose of testing their ability metabolite in biological control fungi direction *F.solani* and *A.alternata* isolated from infected tomato plants with these fungi and collected samples from greenhouses in Diwaniyha. The results showed that all the bacteria isolates were stimulating plant growth, as are all influenced the increase in plant height and root length and dry weight increase and soft grouped to shoot and root and significant difference ($P < 0.05$) for seed treatment fungal pathogens only. Showed *P. aerugionsa* isolated from urinary tract infections at *P.fluorescens* and isolated from soils contaminated by hydrocarbon compounds of high ability to protect tomato plants from fungal infection Pathogenetic.

Key words: Pseudomonas, Biocotrol, tomato.

Microbiology Classification QR 75-99.5

*The research is Apart of on Msc. thesis in case of the second researcher.