تقويم كفاءة بعض عوامل المكافحة الأحيائية في مقاومة الفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لمرض سقوط البادرات على نبات الخيار

رباب مجيد عبد * علي هاشم ** هادي مهدي عبود ***

الملخص

تم اجراء تجربة في الاصص لغرض تحديد بعض آاليات استحثاث المقاومة بواسطة فطر المايكورايزا *G.mosseae* وبكتريا *B.subtilis* وفطر *T.harzianum* ضد الفطر *R.solani* المسبب لمرض سقوط بادرات على نبات الخيار. وقد اظهرت تجربة القابلية الامراضية لعزلتين من الفطر *R.solani* ضراوة عالية على نبات الخيار، اذ سببت انخفاضاً معنوياً في % للانبات وكذلك زيادة معنوية في % لموت البادرات قبل وبعد البزوغ . اظهرت تجربة البيت البلاستيكي قدرة عوامل الاستحثاث الحيوية على زيادة النشاط الانزيمي لانزيم الفنيل الانين امينولايز وانزيم البيروكسديز بوجود وعدم وجود المسبب المرضي، فقد تفوقت معاملة الفطر *T.harzianum* في زيادة سرعة استجابة النباتات ضد الفطر الممرض من خلال زيادة النشاط الانزيمي لكلا الانزيمين في اليوم الخامس من الزراعة، وكذلك تفوقت معاملة التداخل بين فطر المايكورايزا *G.mosseae* وفطر *T.harzianum* على بقية معاملات التداخل في سرعة استجابة النباتات . وقد اظهرت معاملات عوامل الاستحثاث الحيوية جميعها قدرتها على الابقاء على النشاط الانزيمي لكلا الانزيمين مما سبب اختزالاً معنوياً في نسبة موت البادرات وشدة الاصابة بالمرض وقد تفوقت معاملة بكتريا *B.subtilis* لوحدها على بقية المعاملات اذ كانت نسبتي موت البادرات وشدة الاصابة بالمرض هما 13.33% و 12.5% على التوالي قياساً بالمقارنة (الفطر *R.solani* فقط) وكانتا 100% و100% على التوالي .

المقدمة

تعد المقاومة المستحثة في النبات حالة فسلجية تستحث اثناءها القدرة الدفاعية للنبات من خلال التحفيز النوعي لوسائل الدفاع النباتية التي تختلف فيما بينها من حيث الأساس الطبيعي لمركب الاستحثاث ومن حيث طريقة دخول الممرض عبر الأن ةسجة الحية وانتشاره داخل النبات (20، 21) ومن هذه الوسائل الدفاعية تكوين الحواجز الميكانيكية (Mechanical barriers) التي تعد خط الدفاع الأول في نظام حماية النبات كتراكم الكالس واللكنين (35) كذلك تجمع مجموعة من البروتينات المرتبطة بالأمراضية التي تسمى: Pathogenesis - Related Proteins (PR) (33) والفايتولكسين Phytoalexins (12) فضلا عن زيادة نشاط بعض الإنزيمات الدفاعية مثل Peroxidase, Chitinase, Polyphenoloxidase, Phenylalanine ammonia layase ومن الأحياء المحفزة لنمو النبات والتي أظهرت قدرة على استحثاث مقاومة النبات ضد مختلف المسببات المرضية فطر المايكورايزا *Glomus mosseae* وذلك من خلال قدرته على زيادة بناء البروتينات المرتبطة بالأمراضية

جزء من أطروحة الدكتوراه للباحث الأول

* كلية التربية للعلوم الصرفة – بغداد، العراق.

** كلية العلوم للبنات – جامعة بغداد– بغداد، العراق.

*** دائرة البحوث الزراعية/ وزارة العلوم والتكنلوجيا

وزيادة نشاط بعض الانزيمات الدفاعية كالـ Peroxidase وPolyphenoloxidase و Glucanase وChitinase (7، 29، 30) ومن الأحياء التي أثبتت كفاءتها في استحثاث المقاومة في النبات ضد الفطر *R.solani* هو فطر المكافحة الإحيائية*Trichoderma harzianum* ، اذ وجد أن لهذا الفطر القدرة على استحثاث بناء التربنويدات (Terpenoids compounds) في جذور نبات القطن التي لها دور في مقاومة المسبب المرضي (16) كما ذكر محمد آل مراد (2) أن للفطر *Trichoderma* spp. القدرة على زيادة فعالية انزيم البيروكسيديز وانزيم بولي فينول اوكسيديز، كذلك زيادة محتوى نبات اللوبيا من الفينولات الكلية عند وجود المسبب المرضي *Macrophomina phaseolina* . ووجد Al-karsar (7) ان للفطر *T. harzianum* القدرة على استحثاث مقاومة نبات البطاطا ضد الفطر *R. solani* من خلال زيادة نشاط بعض الإنزيمات الدفاعية التي كانت Chitinase و β-1,3glucanase . كما تعد بكتريا *Bacillus* sp. من أحياء التربة المحفزة للنمو كذلك أثبتت العديد من الدراسات قدرتها على تثبيط نمو وأمراضية العديد من المسببات المرضية (4).

المواد وطرائق البحث

تحضير عزلات عوامل الاستحثاث الحيوية

عزلة الفطر Rifia*Trichoderma harzianum* :- تم الحصول على عزلة كفوءة من د.هادي مهدي عبود / مختبر المبيدات الفطرية / دائرة البحوث الزراعية .

عزلة فطر المايكورايزا *Glomus mosseae* تم عزلها باستخدام طريقة الغربلة الرطبة الموصوفة من قبل Gerdeman وNicolson (13) وتم إكثار العزلة على نبات الذرة البيضاء باستخدام طريقة البوغ المفرد .

عزلة بكتريا *Bacillus subtilis* تم عزل البكتريا من تربة مزروعة بنبات ألجت وتم تشخيصها حسب ما ذكره Holt وجماعته (15) من خلال دراسة صفاتها المظهرية وقابلية الاصطباغ بصبغة كرام وقابليتها على تحليل النشا حسب الطريقة الموصوفة من قبل Mamo وجماعته (22).

عزلة الفطر الممرض

تم عزل الفطر *Rhizoctonia solani* من بادرات نبات الخيار والباميا ظهرت عليها أعراض مرض سقوط البادرات، وتم تشخيص العزلتين بعد ظهور النمو الفطري على الوسط الزرعي PDA بالاعتماد على الصفات التصنيفية التي ذكرها Parmeter وWhitney (27) وتم تصبيغ الانوية للتأكد من التشخيص وحسب ما ذكر في Runion و Kelley (31).

اختبار القابلية الامراضية

لغرض اختبار القابلية الامراضية لعزلتي الفطر الممرض *R. solani* تم إجراء تجربة في الأصص البلاستيكية استخدم فيها تربة مزيجيه – رملية معقمة بجهاز المؤصدة على درجة حرارة 121 سليليزية وضغط 1.5 كغم/سم^{2}لمدة 30 دقيقة وكررت عملية التعقيم بعد 24 ساعة . ثم وضعت التربة في أصص بلاستيكية سعة 1/2 كغم وتم تلويث التربة بالفطر الممرض المنمى على وسط PDA وذلك بواقع 1/4 طبق لكل أصيص وبثلاثة مكررات لكل عزلة وتركت معاملة بدون إضافة الفطر الممرض (معاملة السيطرة) وتمت إضافة الفطر الممرض إلى التربة قبل يومين من الزراعة وبعدها زرعت بذور نبات الخيار صنف محلي بعد تعقيمها سطحياً بمحلول هايبوكلورات الصوديوم 1% كلور حر وبواقع 10 بذور لكل أصيص وتم سقي الأصص حسب الحاجة . وبعد مرور 15 يوماً من الزراعة تم حساب النسبة المئوية للإنبات و موت البادرات قبل وبعد البزوغ .

تجربة البيت البلاستيكي

لغرض دراسة تأثير عوامل استحثاث المقاومة الحيوية وهي فطر المايكورايزا ***G.mosseae*** الفطر ***T. harzianum*** وبكتريا ***B. subtilis*** في استحثاث بعض آليات المقاومة في نبات الخيار ضد الفطر الممرض ***R. solani*** لذا تم إجراء تجربة في البيت البلاستيكي في دائرة البحوث الزراعية في الزعفرانية اثناء الموسم **2012–2013** وتضمنت التجربة الخطوات التالية :–

تهيئة التربة والأصص/استخدم في هذه التجربة خليط من تربة مزيجيه – رملية و بتموس بنسبة **1:3** كغم، اذ تم تعقيم البتموس بجهاز المؤصدة على درجة حرارة **121** سليليزية وضغط **1** كغم/سم^2 لمدة ساعة مع إعادة التعقيم بعد **24** ساعة . وضع خليط التربة والبتموس في أصص بلاستيكية سعة **3** كغم .

إضافة لقاح عوامل استحثاث المقاومة الحيوية : تمت اضافة لقاح الفطر ***T. Harzianum*** *إلى* التربة بعد تحميله على كوالح الذرة، اذ أضيف بواقع **2**غم/كغم تربة. أما فطر المايكورايزا ***G. mosseae*** فقد أضيفت عزلة الفطر إلى التربة بعد تنميتها على جذور نباتات الذرة البيضاء وأضيفت إلى التربة بشكل خليط من الجذور والتربة المحيطة بها بواقع **10** غم / كغم تربة .أما بكتريا ***B. subtilis*** فقد أضيفت إلى التربة بشكل عالق بمعدل **10** مل/كغم من تركيز **1x** 10^9 وحدة/مل وتم إضافة عوامل الاستحثاث جميعها إلى التربة قبل يومين من الزراعة. فيما يخص الفطر الممرض فقد أضيف إلى التربة بعد تنميته على كوالح الذرة وذلك بواقع **1**غم/كغم تربة وأضيف الى التربة قبل يومين من زراعة بذور نبات الخيار المعقمة سطحيا بواقع **10** بذرة / أصيص وتضمن التجربة **16** معاملة وكررت كل معاملة ثلاث مرات ليصبح مجموع المعاملات ومكرراتها **48** وحدة تجريبية .

ولغرض قياس النشاط الأنزيمي للأنزيمين **Peroxidase** و**Phenylalanine ammonia layase** اخذت عينات عشوائية من النباتات في خمس مدد زمنية متساوية هي **20,15,10,5** يوماً واتبعت الطرق التالية لغرض تقدير النشاط الإنزيم يللإنزيمات السابقة

تقدير نشاط إنزيم **Peroxidase** (**Per**)/ اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل **Hammerschmidt** وجماعته (**11**) ، إذ تم سحق **1** غم من المجموع الخضري والجذري للنباتات المعاملة بالفطر الممرض وغير المعاملة بالفطر الممرض و تم سحقها مع **2** مل من دارئ الفوسفات (**0.1 M , pH 7**) واخذ المزيج ووضح في جهاز الطرد المركزي على **14000** دورة / دقيقة لمدة **15** دقيقة بعدها اخذ العالق الذي يمثل مستخلص الإنزيم . ولغرض قياس نشاط أنزيم البيروكسيديز تم اخذ **0.5** مل من مستخلص الإنزيم وأضيف إليه **0.05** مل من **Pyrogallol** ويبدأ التفاعل عند إضافة **0.5** مل من H_2O_2 بتركيز **1%** ويحفظ مزيج التفاعل على درجة حرارة الغرفة 28 ± 2 C^o ويسجل التغير في الامتصاصية باستخدام جهاز المطياف الضوئي على الطول ألموجي**420nm** كل دقيقة ولمدة **3** دقائق تقدير نشاط إنزيم **Phenylalanine ammonia layase**(**PAL**)/ اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل **Dickerson** وجماعته (**11**) إذ تم سحق **1** غم من العينة النباتية في جفنه خزفية مع دارئ البورات **pH 8.8** الذي يحتوي على **0.4** مل من **Mercaptoethanol L** $^{-1}$ ثم يوضع المزيج في جهاز الطرد المركزي على **14000** دورة / دقيقة لمدة **15** دقيقة ويؤخذ العالق الذي يؤخذ منه **0.4** مل يضاف إليه **0.5** مل من دارئ البورات **pH 8.8** و**0.5** مل من الفنيل الانين **phenylalanine** (مادة التفاعل) ويحفظ المزيج لمدة **30** دقيقة على درجة حرارة **30** مئوية ويتم إيقاف التفاعل من خلال إضافة **0.5** مل من **Hcl**(**2N**) وذلك بعد حصول التغيير اللوني ويعبر عن نشاط الإنزيم من خلال معدل تحول **L- phenylalanine** إلى **trans – cinnamicacid** ويقاس هذا التحول بواسطة

جهاز المطياف الضوئي على الطول ألموجي **290 nm** ويتم حساب النشاط الإنزيمي للإنزيمات السابقة من خلال المعادلة التالية المذكورة من قبل **Nezih** (**26**).

$$\text{النشاط الإنزيمي(وحدة امتصاص / غم وزن الانموذج)} = \frac{\text{قراءة الجهاز}}{\text{وزن الانموذج / حجم الاستخلاص} \times \text{الحجم الماخوذ للقراءة}}$$

وبعد **45** يوم من الزراعة قدرت الأصابة بالفطر***R. solan*** البادرات وشدة الإصابة بالفطر الممرض ***R. Solani*** حسب الدليل المرضي التالي: –

0 = جذور سليمة**1**؛ = تلون الجذور الثانوية بلون بني فاتح؛ **2**= تلون الجذور الثانوية بلون بني غامق مع إصابة الجذر الرئيي بلون بني فاتح؛ **3** = تلون الجذور الثانوية والرئيسة بلون بني غامق مع إصابة قاعدة الساق وتلونها بلون بني ولكن النبات مازال حيا؛ **4** = موت النبات

$$\text{شدة الإصابة} = \frac{\text{مجموع (عدد النباتات} \times \text{درجة الإصابة}\mathbf{0}) + \ldots\ldots\ldots + (\text{عدد النباتات} \times \text{درجة الإصابة } \mathbf{4})}{\text{العدد الكلي للنباتات x أعلى درجة في سلم الدليل المرضي}} \times \mathbf{100}$$

النتائج والمناقشة

القابلية الامراضية لعزلتي الفطر *R. solani*

ويظهر جدول (**1**) قدرة كلتا العزلتين على إحداث المرض، إذ أدت عزلة الفطر الممرض المأخوذة من نبات الخيار إلى تقليل نسبة الإنبات إلى **6.67** % بالمقارنة مع معاملة السيطرة **96.67**% كما إن نسبتي موت البادرات قبل وبعد البزوغ كانت **93.33**% و **93.33**% على التوالي أما عزلة الفطر ***R. Solani*** المأخوذة من نبات الباميا فقد أظهرت التجربة قدرتها على إحداث المرض على نبات الخيار إذ انخفضت نسبة الإنبات الى **10**% كما كانت نسبتي موت البادرات قبل وبعد البزوغ **90**% و **93.33**%على التوالي.

جدول **1**: تاثير عزلتين من الفطر ***Rhizoctonia solani*** في نسبة الانبات لبذور نبات الخيار و% لموت البادرات قبل وبعد البزوغ

المعاملة	نسبة الانبات	نسبة موت البادرات	
		قبل البزوغ	بعد البزوغ
السيطرة	**96.67**	**0**	**0**
الخيار ***R. solani***	**10.00**	**90.00**	**93.33**
الباميا ***R. solani***	**6.67**	**93.33**	**93.33**
L.S.D	**1.88**	**1.53**	**0**

تتفق هذه النتيجة مع ما توصلت إليه العديد من الدراسات منها رمو (**5**) . وتعكس هذه النتيجة القدرة الامراضية لهذا الفطر والتي قد تعزى إلى قدرته على إنتاج الإنزيمات المحللة التي تساعد الفطر على اختراق العائل وإحداث الإصابة مثل **Cellulase** و **Protease** و **Pectinase** كما أن الفطر يفرز بعض المواد السامة التي تسبب فشلاً لعملية إنبات البذور حسن (**3**) و **Mazzola** (**24**).

تجربة البيت البلاستيكي

النشاط الانزيمي Peroxidaseو Phenylalanine ammonia layase

تظهر الجدولان 1و2 تأثيرعوامل استحثاث المقاومة الحيوية فطر المايكورايزا ***G. Mosseae*** والفطر ***T. harzianum*** وبكتريا ***B. subtilis*** في النشاط الإنزيمي لبعض الإنزيمات الدفاعية في نبات الخيار أثناء مدد زمنية لوجود الفطر الممرض ***R. solani*** عدم وجوده، يظهر الجدول 1 ان الأحياء جميعها المستخدمة في الدراسة قدرتها على زيادة نشاط الإنزيم عند غياب المسبب المرضي وازدادت عند وجود المسبب المرضي ويظهر من الجدول تفوق معاملات الإضافة المنفردة عند عدم وجود المسبب المرض على معاملة المقارنة وقد تفوقت معاملة الفطر ***T. harzianum***على بقية معاملات الإضافة المنفردة في سرعة استجابة النبات حيث كانت قيمة النشاط الإنزيمي لل PAL في اليوم الخامس 9.3084 بينما كانت 9.0406 لمعاملة فطر المايكورايزا و5.7198 لمعاملة بكتريا ***B. subtilis***. كما أظهرت معاملات الإضافة المنفردة جميعها استمرارية واضحة في النشاط الإنزيمي أثناء لمدد المدروسة مع حصول ارتفاع وانخفاض في النشاط الإنزيمي ل PAL ولكنها جميعا تفوقت على معاملة السيطرة وتظهر المعاملة المنفردة لفطر المايكورايزا ***G. Mosseae*** *زيادة* واضحة في النشاط الإنزيمي ل PALخلال الفترتين 5، 10، وأنخفض في المدتين 15، 20 اما المعاملة المنفردة للبكتريا فقد ازدادت استجابة النبات في زيادة النشاط الإنزيمي PALمع زيادة الفترة الزمنية، أما الفطر ***T. harzianum*** فقد أظهرت النباتات استجابة سريعة وواضحة خلال اليوم الخامس وازدادت تدريجيا خلال الفترتين10، 15 وانخفضت في اليوم 20. في معاملات التداخل بين عوامل الاستحثاث الحيوية عند عدم وجود الفطر الممرض .

جدول (1) تأثير عوامل استحثاث المقاومة الحيوية فطر المايكورايزا ***G. mosseae*** و الفطر ***T. harzianum*** وبكتريا ***B. subtilis*** في النشاط الإنزيميلإنزيمPhenylalanine ammonia layase (PAL) ضد الفطر الممرض ***R. solani*** في نبات الخيار .

المعاملة	بدون المسبب المرضي				مع المسبب المرضي			
	المدد الزمنية				المدد الزمنية			
	5	10	15	20	5	10	15	20
Control	2.602	4.741	5.1476	3.1596	0	0	0	0
G. mossea	9.0406	9.277	8.3104	6.795	12.245	20.0805	24.7027	25.0387
B. subtilis	5.7198	7.0896	10.7956	10.1825	12.8732	12.2013	8.4717	7.0157
T. harizanum	9.3084	10.8596	10.434	10.1214	16.5782	19.4401	19.1072	17.0845
G. mossea &B. subtilis	10.7632	10.8012	6.1164	6.2238	11.4038	14.4715	15.6542	19.8867
G. mossea &T. harizanum	9.5032	9.3778	10.36	9.5234	32.2862	27.8062	21.2834	20.3986
B. subtilis &T. harizanum	2.375	3.4944	3.7868	2.4268	6.8141	10.6445	14.7202	16.8235
G. mossea&B. subtilis &T. harizanum	9.2702	8.6206	8.2186	6.8768	16.7776	20.1869	20.5363	22.4190
قيمة L.S.D. عند مستوى 0.05	المعاملات = 0.736؛ الفطر الممرض = 0.245؛ للمدد الزمنية = 0.347							

يظهر الجدول ان معاملة التداخل بين فطر المايكورايزا***G. mosseae*** والبكتريا ***B. subtilis*** قد أظهرت استجابة سريعة في زيادة النشاط الإنزيمي PAL حيث كانت 10.7632 بالمقارنة مع 9.5032 لمعاملة التداخل بين ***G . mosseae***و ***T. harzianum***. أمامعاملة التداخل بين بكتريا***B. subtilis*** و***T. harzianum*** فلم تظهر

النباتات استجابة معنوية وذلك بالمقارنة مع معاملة السيطرة. فيما يخص معاملة التداخل الثلاثي بين فطر المايكورايوزا *G. Mosseae* وبكتريا *B. subtilis* وفطر *T. Harzianum* فقد أظهرت النباتات استجابة سريعة وملحوظة، ولكنها لم تكن أسرع من معاملات التداخل السابقة ، إذ كانت **9.2702** أما بالنسبة لقدرة هذه الأحياء على الحفاظ على النشاط الإنزيمي داخل النبات لأطول مدة ممكنة فقد أظهرت جميع معاملات التداخل قدرتها على الإبقاء على النشاط الإنزيم يلإنزيم **PAL** في نباتات الخيار خلال الفترات المدروسة كافة .

بشأن تأثير عوامل الاستحثاث الحيوية وتداخلاتها في استحثاث النشاط الإنزيم يلإنزيم **PAL** عند وجود الفطر الممرض ***R. solani*** فيظهر جدول (1) قدرتها على زيادة النشاط الإنزيمي بصورة ملحوظة وذلك بالمقارنة مع المعاملات بدون إضافة الفطر الممرض وقد تفوقت معاملة الإضافة المنفردة للفطر ***T. harzianum*** على بقية المعاملات في سرعة استجابة النباتات للمعاملة بها ، إذ كان النشاط الإنزيم يلإنزيم **PAL** في اليوم الخامس **16.5782** وكانت **12.245** لمعاملة فطر ***G. mosseae*** و**12.8732** لمعاملة البكتريا ، اما معاملات التداخل فقد أظهرت معاملة التداخل بين فطر ***T. harzianum*** وفطر ***G. mosseae*** تفوقاً واضحاً على بقية المعاملات للإضافة المنفردة ولمعاملات التداخل في سرعة استجابتها في اليوم الخامس والتي كانت **32.2862** تليها معاملة التداخل الثلاثي بين ***T. harzianum*** و ***G. mosseae*** و***B. subtilis*** التي كانت **16.7776** بخصوص بقية معاملات التداخل فقد أظهرت زيادة في سرعة استجابة النبات لنشاطه الإنزيمي وذلك بالمقارنة مع المعاملات بدون إضافة الفطر الممرض . كما أظهرت معاملات الإضافة المنفردة جميعها ومعاملات التداخل قدرة الأحياء المستخدمة على الإبقاء على النشاط الإنزيمي في المدد المدروسة كافة مع حصول ارتفاع وانخفاض في بعض الأوقات ويظهر جدول (2) قدرة الأحياء جميعها المستخدمة في الدراسة على زيادة نشاط الإنزيم عند غياب المسبب المرضي وازدادت عند وجود المسبب المرضي.

جدول 2: تأثير عوامل استحثاث المقاومة الحيوية فطر المايكورايزا ***G. mosseae*** والفطر ***T. Harzianum*** وبكتريا ***B. subtilis*** في النشاط الإنزيم يلإنزيم **Peroxidase** في نبات الخيار ضد الفطر الممرض ***R. solani***

المعاملة	بدون المسبب المرضي				مع المسبب المرضي			
	للمدد الزمنية				للمدد الزمنية			
	5	10	15	20	5	10	15	20
Control	1.916	1.9548	1.8738	1.8328	0	0	0	0
G. mossea	4.772	4.9028	4.9405	4.9024	11.8589	11.7644	11.486	11.45
B. subtilis	4.889	7.2452	7.842	6.2284	13.36	12.4668	12.3636	11.3824
T. harizanum	4.201	4.2068	4.2354	4.2308	13.7714	15.2592	12.468	12.4664
G. mossea&B. subtilis	6.948	7.2752	7.9396	7.7832	11.7536	11.4888	7.8788	6.4152
G. mossea&T. harizanum	5.659	6.1556	6.2352	6.078	13.2676	13.1036	8.3476	7.9464
B. subtilis&T. harizanum	6.217	6.3368	6.5016	6.6636	12.875	13.8224	13.0636	12.494
G. mossea&B. subtilis& T. harizanum	7.814	7.8644	7.8552	7.6884	12.3992	15.0436	13.1112	12.3876
قيمة L.S.D. عند مستوى 0.05	المعاملات = لا توجد فروقات معنوية؛ الفطر الممرض = 1.515؛ المدد الزمنية = 2.143							

ويظهر من جدول (2) تفوق معاملات الإضافة المنفردة جميعها عند عدم وجود المسبب المرض على معاملة المقارنة وقد تفوقت معاملة بكتريا ***B. subtilis*** على بقية معاملات الإضافة المنفردة في سرعة استجابة النباتات لزيادة نشاطها

الإنزيم يلإنزيمPer إذ كان النشاط الإنزيمي4.889 تليها معاملة فطر *G. mosseae* التي كانت 4.772 ثم معاملة الفطر*T. harzianum* والذي كان النشاط الإنزيمي 4.201 ، وقد أظهرت معاملة البكتريا *B. subtilis* حصول زيادة في النشاط الإنزيمي أثناء جميع الفترات الزمنية المدروسة كافة. أما بالنسبة لمعاملات التداخل بدون المسبب المرضي فقد أظهرت الأحياء المدروسة جميعها كفاءتها في زيادة النشاط الإنزيم يلإنزيمPer وقد تفوقت معاملة التداخل الثلاثي على بقية معاملات التداخل الثنائية فضلا عن معاملات الإضافة المنفردة إذأظهرت هذه المعاملة سرعة واضحة في استجابة النباتات في زيادة النشاط الإنزيم يلإنزيم إذ كان النشاط الإنزيمي 7.814 في اليوم الخامس تليها معاملة التداخل بين *B. subtilis* ,*G. mosseae* والتي كانت 6.948 ثم معاملة التداخل بين*T. harzianum* و *B. subtilis* والتي كانت 6.217 كذلك اظهرت معاملات التداخل كافة قدرتها على الاستمرارية في الإبقاء على النشاط الإنزيميلإنزيم Per مع حصول انخفاض في النشاط الإنزيمي في أخرمدة زمنية مدروسة وهي اليوم 20.

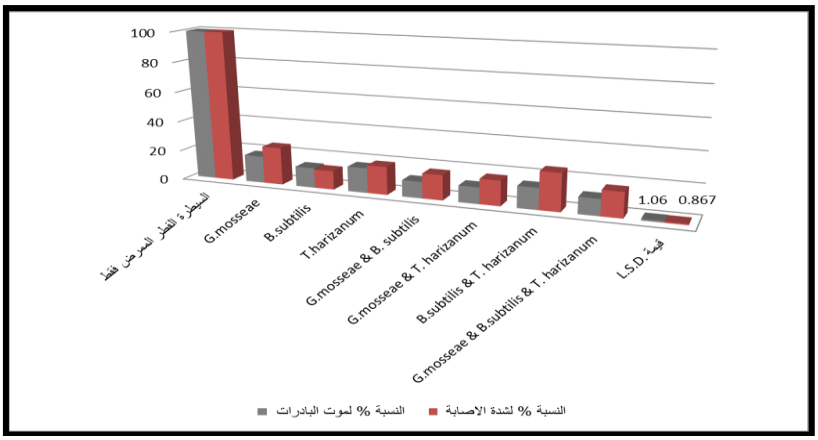
كما يظهر جدول (2) قدرة الأحياء المدروسة كافة على زيادة النشاط الإنزيميلإنزيم Perعند وجود الفطر الممرض *R.solani* وذلك بالمقارنة مع نفس المعاملات ولكن بغياب المسبب المرضي ، وقد أظهرت معاملة الإضافة المنفردة للفطر *T. Harzianum* استجابة سريعة في زيادة النشاط الإنزيمي في اليوم الخامس، إذ كانت 13.7714 تليها معاملة بكتريا *B. subtilis* والتي كانت 13.36 فيما يخص معاملات التداخل فقد أظهرت معاملات التداخل جميعها زيادة في النشاط الإنزيميلإنزيم Per وذلك بالمقارنة مع معاملات التداخل بدون المسبب المرضي . كما نلاحظ حصول انخفاض في النشاط الإنزيميلإنزيمPer بعد اليوم الخامس لكل من معاملة التداخل بين *G. mosseae* و*B. subtilis* ومعاملة التداخل بين *T. harzianum*و*G. Mosseae* بينما أظهرت معاملة التداخل بين *T. harzianum* و *B. subtilis* ومعاملة التداخل الثلاثي زيادة في النشاط الإنزيمي في اليوم 10 تبعه انخفاض في النشاط الإنزيمي في المدتين الزمنيتين 15 و20 يوماً.

أظهرت نتائج الجدولين (1و 2) قدرة فطر المايكورايزا *G. mosseae* وفطر *T. harzianum* وبكتريا *B. subtilis* والتداخل فيما بينهم بوجود المسبب المرضي *R.solani* وعند عدم وجوده على زيادة النشاط الإنزيم يلإنزيم Phenylalanine ammonia layase وإنزيم Peroxidase.، إذ ذكر Jayalakshmi وجماعته (18) أن للفطر*T. harzianum* القدرة على زيادة نشاط الانزيمات بيروكسيديز و بولي فينول اوكسيديز و فنيل النين امينولايز في جذور نبات الحمص وتتفق النتائج السابقة للفطر *T. harzianum* مع ما توصل إليه طه و ابراهيم (6) و الطائي (1). ومن المهم أن نوضح نبذة عن الدور الذي يؤديه حيث إنزيمPAL دور مهم في البناء الحيوي للمركبات الفينولية و الفايتولكسينات (10) كما انه ينتج عن النشاط الإنزيمي لهذا الإنزيم تكون trans- cinnamic acid الذي يعتبر المادة المباشرة لبناء السالسيلك اسيد salicylic acid الذي يعتبر اشارة لاستحثاث المقاومة الجهازية المكتسبة Systemic Acquired Resistance (SAR) في النبات (19).كذلك تتفق النتائج السابقة الخاصة ببكتريا*B. subtilis*مع ما ذكره Nakkeeran وجماعته (25) من قدرة هذه البكتريا على زيادة نشاط العديد من الإنزيمات الدفاعية مثل phenylalaninamonialyase , peroxidase, polyphenol oxidase بالإضافة إلى زيادة محتوى النبات من المركبات الفينولية. أما بالنسبة لفطر المايكورايزا *Glomus*spp.فقد أظهرت هذه النتائج قدرته على حماية النبات من الإصابة بالفطر الممرض *R.solani* من خلال زيادة نشاط إنزيم PAL وإنزيم PER . ففي دراسة اجراها Pozo وجماعته (28) وجدوا أن لفطر المايكورايزا *G. mosseae* و*G. intaradices* القدرة على استحثاث المقاومة الجهازية او الموضعية ضد الفطر الممرض *Phytophthora sp.* من خلال زيادة النشاط الإنزيم يلإنزيمات , β-1-3-glucanase , chitosanase

chitinase. كما ذكر **Jaiti** وجماعته (17) قدرة فطريات المايكورايزا ***Glomus*sp.** على استحثاث مقاومة فسائل النخيل لبعض المسببات المرضية الفطرية من خلال زيادة نشاط إنزيم **Peroxidas** و **Polyphenoloxidase** .

نسبة موت البادرات وشدة الإصابة بالفطر الممرض

يبين شكل (1) تأثير عوامل الاستحثاث الحيوية ***T. harzianum*** و ***G. mosseae*** و ***B. subtilis*** في نسبة موت البادرات وشدة الإصابة بالفطر ***R. solani***في نبات الخيار بعد **45** يوماً من الزراعة في الأصص البلاستيكية، إذ يظهر من الشكل قدرة الأحياء المستخدمة على التقليل من نسبة موت البادرات وشدة الإصابة بالفطر الممرض بشكل كبير، وقد تفوقت معاملة الإضافة المنفردة لبكتريا ***B. subtilis*** على بقية معاملات الإضافة المنفردة في تقليل نسبة موت البادرات وشدة الإصابة إلى **13.33%** و **12.5%** على التوالي وذلك بالمقارنة مع معامل المقارنة بالفطر الممرض فقط التي كانت **100%** لكل من نسبة موت البادرات وشدة الإصابة على التوالي .أما معاملة الإضافة المنفردة للفطر ***T. harzianum*** فقد كانت نسبة موت البادرات وشدة الإصابة بالفطر الممرض هما **16.67%** و **18.75%** على التوالي. تلتهم معاملة فطر المايكورايزا ***G. mosseae*** حيث كانت نسبة موت البادرات وشدة الإصابة بالفطر الممرض **18.18%** و **25%** على التوالي فيما يخص معاملات التداخل فقد أدت معاملات التداخل جميعها إلى حصول اختزال في نسبة موت البادرات وشدة الإصابة بالفطر الممرض ولم تكن هناك فروقات بين معاملات التداخل ما عدا معاملة التداخل بين بكتريا ***B. subtilis*** وفطر ***T. harzianum*** .وتتوافق النتائج السابقة مع نتائج البحث من ان قابلية هذه الاحياء على استحثاث مقاومة النبات من خلال زيادة النشاط الإنزيم يلإنزيم **Po** و **PAL**واستمرار هذا النشاط مع وجود المسبب المرضي وهذا يتفق مع ما ذكره **Nakkeeran** وجماعته (**25**). كما ذكر الباحثان **Arya** و **Kaushik** (**8**) ان لكل من عوامل السيطرة الحيوية المتمثلة بالفطر ***T. harzianum***وبكتريا ***B. subtilis*** القدرة على تثبيط النمو الفطري لفطر ***R. solani*** ضمن المختبر وكذلك وجدا انهما سببا حدوث اختزال في موت البادرات قبل وبعد البزوغ .



شكل 1: تاثير عوامل أستحثاث المقاومة الجهازية فيث النسبة المئوية لموت البادرات وشدة الاصابة بالفطر الممرض ***R. solani*** في نبات الخيار

المصادر

1- الطائي، ورقاء سعيد قاسم (2010). اختبار كفاءة عزلات من *Trichoderma* في استحثاث بعض الانزيمات الدفاعية ضد الفطر *Fusarium oxysporum*f.sp. lycopersici في نباتات الطماطة . مجلة زراعة الرافدين .38(2) .

2- آل مراد، نهال يونس محمد (2011). قدرة بعض عزلاتالفطر.*Trichoderma*s pp على إنتاج إنزيم السيليوليز ودوره في استحثاث المقاومة للفطر *Macrophomin phaseolina* . مجلةعلوم الرافدين. 22(3):46-59 .

3- حسن، محمد صادق (2002). قابلية عزلتين من الفطر *Rhizoctonia solani* على إصابة بادرات اللهانة والقرنابيط والفلفل والباذنجان باعمار مختلفة. مجلة التقني-البحوث التقنية، 15(98):122-128 .

4- رمضان، نديم احمد؛ نجوى بشير الليثي و هبة عصام داود (2009). تاثير المستخلص الكحولي لبذور الرشاد *Lipidium sativum* وراشح المقاوم الحيوي البكتيري *Bacillus cereus* على نمو الفطريات المسببة لتعفن جذور السمسم . مجلة التربية والعلم . 22(4):47-61.

5- رمو، روعة اديب نعيم (1987). دراسة بايولوجية لاربع عزلات من *Rhizoctonia solani* المعزولة من القرعيات وتاثير بعض المبيدات عليها . رسالة ماجستير . قسم الوقاية . كلية الزراعة . جامعة بغداد، العراق .

6- طه، خالد حسن وبسام يحيى ابراهيم (2010). طرز حيوية جديدة من الفطر *Trichoderma* spp.كفؤة في استحثاث مقاومة نباتات الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* ضد الفطر *Rhizoctonia solani* . مجلة زراعة الرافدين .38(2) .

7- Al-askar, A.A. and J.M. Rashad (2010). Arbuscular mycorrhizal fungi: Abiocontrolagent against common bean *Fusarium* root rot disease. Plant .Pathol.J. 9:31-38

8- Arya, S. and J.C. Kanskik (2003). Evaluation of fungal and bacterial antagonists seed treatment for controlling damping-off disease in forstnur series .PertanikaJ. Trop. Agric. Sci., 26(2):115-121.

9- Blilou, I.; P. Bueno; J.A. Ocampo and J.M. Garcia-Garrido (2000). Induction ofcatalase and ascorbate peroxidase activities in Tobacco roots inoculated with the Arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* .Mycol. Res., 104:722-725.

10- Daayf,F.; R. Bel-Rhlid and P.R. Belanger (1997). Methyl ester of P-coumaric acid: Aphytoalexin like compound from long English cucumber leaves. J. of Chem. Ecol., 23:1517-1526.

11- Dickereson, D.P.; S.F. Pascholati; A.E. Hagerman; L.G. Butler and R.L Niholson (1984). Phenylalanin ammonia lyase and hydroxyl cinnamate: CoA ligase in maize mesocotyls inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum*. Phys. andMolec. Plant Patho., 25:111-123.

12- Dixon, R.A. (1986). The phytoalexinresponce :Elicitation , signaling and control of host gene expression. Biol .Rev. Camb.Philos.Sco., 61:239-292.

13- Gerdemann, J.W. and T.H. Nicolson (1963). Spores of mycorrhizal Endogone extracted fromsoil by wet sieving and decanting. Trans. Brit. Mycol. Soc. 46.235-244.

14- Hammershmidt,R.; E.M. Nuckles and J. Kuc (1982). Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistence of cucumber to *Colletotrichumla geranium* .Physo. and Molec. Plant Patho. 20:73-82.

15- Holt, J.O.; N.R. Kring; P.H. Senath; J.J. Staly and S.T. Willrams (1994). Beregeyṡ manual of determination bacteriology, 9th.v.s.a.

16- Howell, C.R.; J.E. Devay; R.H. Garber and W.E. Batson (1997). Field control ofcottonseedling disease with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatments. J. CottonSci., 1:15-20.

17- Jaiti, F.; A. Meddich and I. El-Hadrami (2007). Effectveness of Arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against Bayouddisease .Physol.Mol. Plant Pathol. 71(4-6):166-173.

18- Jayalakshmi, S.K.; S. Raju; S. Usharani; V.I. Denagi and K. Sreeramulu (2009). *Trichoderma harizanum* L1 as potential source for Lytic enzymes and elicitor of defense responses in Chickpea (*Cicera rietinum* L.) against with disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. Cieeri. Australian J. of Crop Sci. 3:44-52.

19- Klessig, D. and F. Malamy (1994).The salicylic acid signaling in plant. Plant Molecular Biology. 26:1439-1458.

20- Knoester, M.; C.M.J. Pieterse; J.E. Bol and L.C. Van Loon (1999). Systemic resistance in arabidopsis induced by *Rhizobacteria vequires* ethylene dependent signaling at the site of application. Mol. Plant. Microb. Interact. 12: 720 – 727.

21- Maleck, K.; A. Levine; T. Eulgem; A. Morgan; J. Schmid; K.A. Lawton; J.L. Dangl and Dietrich,R. A. (2000). Thetranscriptome of arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance. Net. Genet. 26: 403 – 410.

22- Mamo,G.; B.A. Gashe and A. Gessess (1999). A highly thermostable amylase from anewly isolated thermophilic *Bacillus* sp. W1L.J. Appl. Micrb. 86:

23- Mazen, M.M.; N.H. El-batanony; M.M. AbdEl- Monium and O.N. Massoud (2008). Cultural filtrate of *Rhizobium* spp. and Arbuscular mycorrhiza are potential biological control agents root rot fungal diseases of Fababean .Global j. Biotech. Biochem. 3(1): 32-41.

24- Mazzola, M. (1997). Identification and patho-gencity of *Rhizoctonia* spp. isolate from apple roots and orchard soils. Phytopathology .87:582-587.

25- Nakkeeran, S.; K. Kavitha; G. Chandrasekar; P. Renukadevi and W. Fernando (2006). Induction of plant defence compounds by *Pseudomonas chlororaphis* PA23 and *Bacillus subtilis* BSCBE4 in controlling damping -off of hot pepper caused by *Pythiumaphani dermatum* .Biocontrol Sci. tech., 16(4):403-416.

26- Nezih, M. (1985). The peroxidase enzyme activity of some vegetables and its resistance to heat .Food Agric. 36:877-880.

27- Parmeter, J.R. and H.S. Whitney (1970). Taxonomy and Nomenclature of the imperfect stage in: Rhizoctonia solani biology and pathology. University of California Barkely .Los Angeless pp: 7-19.

28- Pozo, M.J.; C. Cordier; E. Dumas-Gaudat; S. Gianinazzi; J.M. Barea and C. Azcon-Aguilar (2002). Localized versus systemic effect of Arbuscularr mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in Tomato plants .J. of Experimental Botany. 53(368):525-534.

29- Pozo, M.J. and C. Azcon – Agular (2007). Unraveling mycorrhiza - induced resistance .Current Opinion in Plant Biology. 10:393-393.

30- Pozo, M.J.; C.Azcon-Aguilar; E. Dumas-Gaudat and J.M. Barea (1998). Chitosanaseand chitinase activities in tomato roots during interactions with Arbuscular Mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica*. J. of Experimental Botany. 49(327):1729-1739.

31- Runion, G.B. and W.D. Kelley (1993). Characterization of binucleate *Rhizoctonia* species causing foliar blight of Toblollypine .Plant Disease. 77: 754-755.

32- Shaul,O.; S. Galili; H. Volpin; I. Ginzberg; Y. Elad; L. Chet and Y. Kapnlnik (1999). Mycorrhiza- induced changes in disease severity and pr protein expression in tobacco leaves . MPMI., 12(11):1000-1007.

33- Somssich, I.E. and K. Hahibrock (1998). Pathogen defence in plants - a paradig of biological complexity . Trends in Plant Sci., 3:86-90.

34- Whipps, J.M. (2004). Prospects and Limitations for Mycorrhizas in biocontrolof rootpathogenes . Can. J. Bot., 82:1198-1227.

35- Yedidia, I.; N. Benhamou; Y. Kapulnik, and I. Chet (2000). Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite Trichoderma harzianum strain T-203. Plant Physiol. Biochem., 38:863-73.

INDUCED SOME MECHANISMS OF RESISTANCE BY AM FUNGUS *G.mosseae* AND *Bacillus subtilis* BACTERIUM AND *Trichoderma harizanum* FUNGUS AGAINST *R. solani* THE CAUSAL AGENT OF CUCUMBER DAMPING-OFF DISEASE

R.M. Abed* A. Hashim H.M. Aboud*****

ABSTRCT

The xperiment was conducted in pots to detect some mechanisms of induced resistance by mycorrhizal fungus *G.mosseae,* the bacterium *B. subtilis* and the fungus *T. harizanum* against *R. solani* the causal agent of cucumber damping - off. The results of pathogencity of two isolates of *R. solani* showed high virulence for two isolates on cucumber plant .asmanifested by significant decrease in the percentage of germination as well as a significant increase in the rate of preemergance and postemergance seedling infection.

The experiment of greenhouse showed the ability of the tested biotic inducer agents to increase the enzymatic activity of phenylalaninamonialyase and peroxidase enzyme in the absence and presence of pathogen. the*T. harizanum* treatment was excel in increased the speed of response in plant against pathogen through increase the activity of each enzymes in 5 days of agriculture . as well as the treatment of combination between *T. harizanum* and *G. mosseae* are excel of all interaction treatments in the increase the speed of plant response . The results also showed the stability of enzymatic activity for both enzymes which caused a significant reduced in the percentage of seedling death and the severity of disease and the separately treatment of *B. subtilis* excel of all separated treatments in the percentage of seedling death and severity of disease which are (13.33% and 12.5%) respectively compared with control treatment (*R.solani* only) which recorded (100% and 100%) respectively .

Part of Ph.D. thesis for the first author.

*** College of Education for Pure Science .- Baghdad, Iraq.**

**** College of science for women- Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq.**

***** Ministry of Sci. and Tec.– Baghdad, Iraq.**