

فعالية بكتريا *Pseudomonas fluorescens* و *Rhizobium leguminosarum* ضد فايروس موزائيك الفاصولياء الأصفر

رقيب عاكف العاني

أستاذ

سعد محسن المياحي*

باحث

saadmhseen@yahoo.com

قسم وقاية النبات - كلية الزراعة - جامعة بغداد

المستخلص

أجريت الدراسة لتقييم كفاءة البكتريا العقدية *Rhizobium leguminosarum* والبكتريا *Pseudomonas fluorescens* في تحفيز المقاومة الجهازية في نباتات الباقلاء ضد الفايروس موزائيك الفاصوليا الأصفر (BYMV). غمرت بذور باقلاء في معلق متكون من *R. leguminosarum* و *P. fluorescens* وخلطت منهما. اعدت النباتات الناتجة من هذه البذور بالفايروس BYMV بعد الإنبات ثم اخذت أطوال النباتات والوزن الطري والوزن الجاف للمجموع الخضري والمجموع الجذري، وقد اظهرت النتائج أن نسبة الإصابة في النباتات الناتجة من بذور معاملة بالبكتريا *P. fluorescens* و *R. leguminosarum* وخلطت منها كانت صفرا في حين بلغت نسبة الإصابة في النباتات الناتجة من بذور معاملة بالعوامل الثلاثة المذكورة أنفا والمعدة بالفايروس 26 و 25 و 20% بالتتابع مقارنة بنسبة إصابة صفرا في المقارنة (نبات سليم) ونسبة إصابة 92% في النباتات المعدة بالفايروس فقط (مقارنة)، كما جرت متابعة لتركيز الفايروس في النبات مصليا بتقنية اليزا Double antibody sandwich Enzyme Linked Immunosorbent assay (DAS. ELISA) بعد 50 يوما من الزراعة باستعمال أجسام مضادة متعددة الكلونات لفايروس موزائيك الفاصوليا الأصفر. حدث انخفاض كبير في تركيز الفايروس في النباتات الناتجة من بذور معاملة بالبكتريا والمعدة بالفايروس إذ بلغت قيمة الامتصاص على الطول الموجي 405 نانومتر لمستخلص من نباتات معاملة بالبكتريا وخلطت منهما 0.225 و 0.240 و 0.150 بالتتابع وبنسبة تثبيط 59.76 و 57.00 و 72.00% بالتتابع مقارنة بقيمة امتصاص 0.048 في النباتات السليمة والمعاملة بالبكتريا وغير معدة بالفايروس، وقيمة امتصاص 0.558 في النباتات المعدة بالفايروس فقط (مقارنة). أدى تغطيس البذور بالبكتريا إلى تحسين معايير النمو في النباتات الناتجة من هذه البذور.

كلمات مفتاحية: العقد البكتريا، مكافحة، بكتريا، فايروس موزائيك الفاصوليا الأصفر.

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 45(6): 593-601, 2014 **Al-Mayahi & Al-Ani**

THE EFFECTIVENESS OF THE BACTERIA *PSEUDOMONAS FLOURESCENS* AND *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* AGAINST BEAN YELLOW MOSAIC VIRUS

S. M. Al-Mayahi*

Researcher

saadmhseen@yahoo.com

R. A. Al-Ani

Prof.

Dept. of Plant Protection – Coll. of Agric. – Univ. of Baghdad

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate the efficiency of *Pseudomonas fluorescens* and *Rhizobium leguminosaruato* induce systemic resistance in broad bean plants against bean yellow mosaic virus (BYMV). Broad bean seeds were submerged in suspension of *R. leguminosarua*, *P. fluorescens* and combined of them. plants emerged from these seed were inoculated with BYMV at three stages after germination. Plants height, foliage fresh weight, root fresh weight, foliage dry weight, root dry weight, Results showed that the disease incidence in plants emerged from seed treated with *R.leguminosarua*, *P. fluorescens* and combined of them were zero%. The decease incidence in plants emerged from seeds treated with the three above agents and inoculated with BYMV were 26, 25 and 20% respectively compared with zero% in control (healthy plant) and 92% in BYMV infected plants, and virus concentration in the plant, by DAS- Elisa using polyclonal antibodies for BYMV after 50 days of cultivation. High reduction in virus, concentration in plants from treated seeds and inoculated with virus was absurd. The absorbance values at 450 nm of extracts from plant treated with *P. fluorescens*, *R.leguminosarum* and combined of them 0.225, 0.240 and 0.150 respectively with inhibition percentages 59.75, 57.00 and 72.00% respectively compared with absorbance values 0.048 with extracts from healthy plants and in plants emerged from treated seeds non-inoculated with BYMV and 0.558 of extract from BYMV infected plants submersion of seed in bacterial suspension induced significant promotion in plant growth parameters.

Key words: Nodulation, control, Bacteria, BYMV

*Part of M.Sc.Thesis of the first author.

المقدمة

ينتمي محصول الباقلاء (*Vicia fabae* L) إلى العائلة البقولية التي تحتل المرتبة الثانية بعد العائلة النجيلية من حيث الأهمية وتبلغ المساحة المزروعة بهذه المحاصيل في العالم حوالي 180 مليون هكتار أي ما يعادل 12-15% من مساحة الرقعة الزراعية على كوكب الأرض ويشكل الإنتاج العالمي منها حوالي 27% من إنتاج الحبوب في العالم وتحتوي حبوبها على 33% من البروتين (8). يتعرض محصول الباقلاء إلى الإصابة بالعديد من الأمراض ومنها الأمراض الفيروسية (29) ويعد مرض موزائيك الفاصولياء الأصفر أحد أكثر الأمراض انتشاراً في حقول الباقلاء في الدول العربية (13). ينتقل فايروس موزائيك الفاصولياء الأصفر بالعديد من حشرات المن بطريقة غير باقية، وأشارت الدراسات إلى أن عدداً من أنواع البكتريا في التربة التي تنمو على وحول جذور النباتات تمتلك القدرة على تحسين نمو النباتات فضلاً عن كفاءتها في تحفيز الوسائل الدفاعية في النباتات ضد المسببات المرضية ومن هذه البكتريا *P.f* و *R spp* وأن بعضهما أثبت كفاءة في تحفيز مقاومة في النبات ضد الفايروسات (29). كما استعملت البكتريا المحسنة لنمو النبات *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) في مقاومة الأمراض الفيروسية (23). هدفت هذه الدراسة لتقييم كفاءة بكتريا *P.f* و *R.l* في تحفيز المقاومة الجهازية في النباتات ضد فايروس موزائيك الفاصولياء الأصفر.

المواد والطرائق

جمع العينات

جمعت عينات من نباتات باقلاء تظهر عليها أعراض موزائيك مع تشوه في قمة النبات المصاب من حقول كلية الزراعة-جامعة بغداد ومن حقول في اليوسفية والصويرة.

الاختبار المصلي DAS - ELISA

اعتمد اختبار اليزا Enzyme-linked Immuno sorbent Assay (ELISA) في تشخيص فايروس موزائيك الفاصولياء الأصفر (BYMV) في العينات التي جمعت من الحقول واستعمل مصل مضاد لفايروس موزائيك الفاصولياء الأصفر مجهز من شركة NEOGEN الانكليزية وبحسب اختبار (6).

الحصول على عزلة نقية للفايروس

اعتمد نبات الزربيح *Chenopodium amaranticolor* الذي يستجيب للفايروس بتكوين بقع موضعية مصفرة على الأوراق المعدة. قطعت بقعة بشفرة معقمة وسحقت بكمية من محلول دارى الاستخلاص في هاون خزفي ولقحت نباتات الباقلاء بهذا المستخلص، وبعد ظهور الأعراض على النباتات تم التأكد من كون هذه الفايروس يعود إلى فايروس BYMV باختبار اليزا المصلي.

البكتريا

تم الحصول على عزلة من بكتريا *P. f* من الاستاذ عدنان عيسى مختبرات قسم الوقاية-كلية الزراعة-جامعة بغداد، أما بكتريا الرايزوبيا فقد تم عزلها من عقد بكتيرية على جذور نبات الباقلاء وتم تشخيصها من خلال الاختبارات الكيموحيوية.

جمع العقد البكتيرية

قلعت نباتات باقلاء من الحقل، ثم غسلت جذورها جيداً بالماء، واختيرت العقد البكتيرية ذات اللون الوردي من النباتات، واخذت العقد من الجذور بعناية ووضعت في علب صغيرة تحتوي ماء مقطراً لمنع جفافها قبل التعقيم.

تعقيم العقد

استعملت ثلاثة دوارق زجاجية مخروطية الشكل سعة 50 مليلتر وضعت حسب التسلسل الدورق الأول يحوي هيبوكلووريت الصوديوم (القاصر) 20% والدورق الثاني والثالث يحتويان ماء مقطراً معقم داخل Laminar. غطست العقد في هيبوكلووريت الصوديوم (القاصر) 20% لمدة (1-3) دقائق، ثم نقلت بواسطة الملقط المعقم مباشرة إلى الدورق الثاني الذي يحوي على ماء مقطر معقم لمدة ثلاث دقائق، ونقلت إلى الدورق الثالث مع تحريكها واستبدال الماء في الدورق لسبع مرات متتالية ولمدة دقيقة في كل مرة، تركت العقد في ماء الغسلة الأخيرة في الدورق الثالث.

عزل وتنمية الرايزوبيا من العقد

نقلت العقد بالملقط المعقم إلى أنبوبة اختبار معقمة مع قطرتين ماء مقطر معقم وتمت هذه العملية داخل Laminar. سحقت العقد في قعر الأنبوبة بنهاية قضيب زجاجي رفيع معقم، واخذ جزء من المعلق بواسطة ابرة تلقح ولقح به الوسط الزرعي Yeast manitol congo red

معقم. غطست البذور في المزرعة البكتيرية السائلة مضافاً إليها الصمغ العربي بنسبة 5 غم/لتر لمدة ساعة ثم زرعت البذور في تربة مزيجية معقمه في اصص ذات بلاستيكية قطرها 25 سم بمعدل 5 بذور/اصيص. اعدت مجموعة من النباتات باللقاح الفيروسي ميكانيكا بعد الإنبات. اجريت متابعة للنباتات لتقدير نسبة الاصابة ومعايير النمو (طول النبات والوزن الطري والوزن الجاف) وتركيز الفيروس في النباتات المعاملة بتقنية اليزا، وكانت المعاملات على النحو التالي

T1: بذور باقلاء معاملة بالبكتريا *P. f.*

T2: بذور باقلاء معاملة بالبكتريا *R. l.*

T3: بذور معاملة بخليط من البكتريا *P. f.* و *R. l.*

T4: بذور باقلاء معاملة بالبكتريا *P. f.* والنباتات معداة بالفايروس.

T5: بذور باقلاء معاملة بالبكتريا *R. l.* والنباتات معداة بالفايروس.

T6: بذور معاملة بخليط من البكتريا *P. f.* و *R. l.* والنباتات معداة بالفايروس.

T7: نباتات معداة بالفايروس والبذور غير معاملة بالبكتريا (مقارنة).

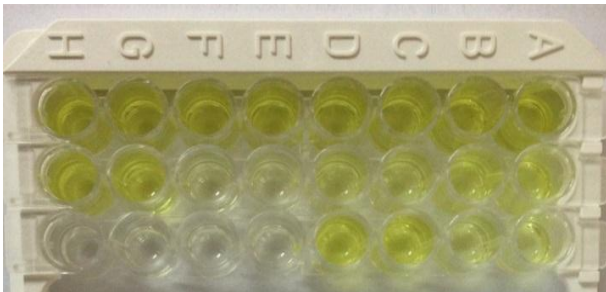
T8: نباتات سليمة غير معاملة وغير معداة بالفايروس (مقارنة).

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص الفايروس

اختبار اليزا

ظهر تفاعلا موجبا بين الاجسام المضادة ومستخلصات نباتات مصابة جمعت من الحقول المزروعة بمحصول الباقلاء بشكل لون أصفر في الحفر الحاوية على مستخلصات النباتات المصابة ولم يظهر اللون في حفر المقارنة الحاوية على مستخلص نبات سليم، واخضع الفايروس لدراسة الأعراض على بعض العوائل النباتية.



شكل 1. طبق اختبار اليزا يوضح تفاعل مستخلص نباتات

مصابة بفايروس BYMV مع المصل المضاد للفايروس

agar في أطباق بتري بطريقة التخطيط ثم حضنت بدرجة حرارة 28 مئوية بصورة مقلوبة مدة خمسة ايام، ثم اخرجت الاطباق في اليوم الخامس من الحاضنة ووضعت على درجة حراره 4 مئوية.

تنقية عزلات الرايزوبيا

انتخبت مستعمرات منفردة على الوسط الزرعي الغذائي Yeast manitol congo red agar ونقلت إلى وسط زرعي غذائي جديد في اطباق بتري، وبعد ظهور نمو المستعمرات وضعت الاطباق بدرجة حرارة 4 مئوية لايقاف النمو.

تحضير اللقاح السائل

أخذ جزء من النمو البكتيري رايزوبيا والسيدوموناس النامية على الوسط الزرعي الصلب ولقح به الوسط الزرعي السائل في دوارق زجاجية حجم 2 لتر، وحضنت الدوارق في حاضنة رجاجة على 100 دورة/دقيقة ودرجة حرارة 28 مئوي لمدة ثلاثة أيام بالنسبة لعزلات الرايزوبيا (5)، وعلى 150 دورة/دقيقة ودرجة حرارة 30 مئوي لمدة يوم واحد بالنسبة لعزلة السيدوموناس. رفعت الدوارق من الحاضنة ووضعت في درجة حرارة 4 مئوي لإيقاف نمو البكتريا. قدر عدد الوحدات البكتيرية للمستعمرات Colony Forming Units (CFU) في المزرعة البكتيرية وحدد العدد المستعمل في التجربة بـ 10^8 خلية/مل وبذلك أصبحت هذه المزرعة البكتيرية جاهزة للاستعمال لمعاملة البذور.

اختبار تأثير بكتريا *P. f.* و *R. l.* في مرض موزائيك الفاصولياء الأصفر على نبات الباقلاء

نفذت التجربة في البيت الزجاجي التابع لقسم وقاية النبات/كلية الزراعة/جامعة بغداد. عقت تربة مزيجية بغاز بروميد المثل 500 غم/م³ وتركت مكشوفة لمدة 15 يوماً قبل الاستعمال، ووزعت التربة في اصص بلاستيكية قطر 25 سم وبمعدل 4 كغم/اصيص، بعد تعقيمها بمحلول هايبيوكلورات الصوديوم (القاصر) 20%، ثم ازيلت بقايا هذه المادة بغسل السطح جيداً بالماء المقطر المعقم، وعقت بذور باقلاء صنف محلي سطحيا بغمرها في هايبيوكلورات الصوديوم (القاصر) 20% لمدة 2-3 دقائق ثم غسلت البذور جيداً في ماء مقطر معقم للتخلص من هايبيوكلورات الصوديوم، وجففت البذور على أوراق ترشيع كبيرة في مكان

على الوسط الزرعي Yest extract mannitol agar (YEM) (شكل 4)، واطهر الفحص بالمجهر لمسحة من النمو ووجود البكتيري خلايا بكتيرية عصوية الشكل سالبة لصبغة كرام مفردة وبشكل سلاسل من خليتين.



شكل 4. نمو بكتريا *Rhizobium leguminosarum* على

الوسط Yest extract mannitol agar (YEM)

جدول 1. التحاليل الكيموحيوية لبكتيريا الرايزوبيا

الفحوصات	النتائج
شكل المستعمرة	محدب
لون المستعمرة	ابيض كريمي
شكل الخلية	عصوي
صبغة كرام	-
انزيم الكاتلايز	+
انزيم الاوكسيديز	+
انزيم اليوريز	+
اختزال النترات	+
استهلاك الاسترات	+
تحلل الجلوتين	+
تحلل الارجنين	+
اكسدة السكريات	سكروز
	مالتوز

نتائج تشخيص البكتيريا فقد جاءت مطابقة لعدد من الفحوص المقترحة في شكل ولون المستعمرة ونجاح البكتريا في تكوين عقد بكتيرية على جذور نباتات الباقلاء، وقد اشارت دراسات سابقة إلى نتائج مماثلة فيما يتعلق بهذه البكتريا.

كفاءة بكتريا *P.f* و *R.l* في منع تضاعف الفايروس

اظهرت النتائج أن تغطيس بذور الباقلاء في معلق للبكتريا *P.f* والبكتريا *R.l* وخليط منهما والمعدة بالفايروس ادى إلى خفض واضح ومعنوي لنسبة الاصابة بالفايروس بلغت 26% و 25% بالتتابع على النباتات الناتجة من بذور معاملة بنوعي البكتريا قياسا بمعاملة المقارنة (معدة بالفايروس فقط) والتي بلغت فيها نسبة الاصابة 92% كما ادت المعاملة بنوعي البكتريا *P.f* و *R.l* إلى خفض معنوي في تركيز الفايروس في الأوراق المصابة، كما اظهر تقدير قيم الامتصاص في

العدوى الميكانيكية

نبات الباقلاء

ظهرت على نبات الباقلاء المعدة بمستخلص من أوراق نباتات باقلاء مصابة، تظهر عليها أعراض موزائيك وتشوه وتقزم جمعت من الحقل، أعراض توضح العروق بعد أسبوع من العدوى اعقبها ظهور موزائيك أصفر أو أخضر على الأوراق مصحوب بتشوه وتجدد الأوراق القمية الحديثة (شكل 3). ذكرت أعراض مماثلة على نباتات باقلاء معدة بفايروس موزائيك الفاصوليا الأصفر (شكل 2).



شكل 2. أعراض إصابة نبات الباقلاء *Vicia faba* بفايروس

موزائيك الفاصوليا الأصفر (BYMV) (1) نبات سليم (2)، (3)

أعراض الإصابة بفايروس BYMV.

نبات الزربيج

ظهرت على أوراق نبات الزربيج المعدة بمستخلص من أوراق نباتات باقلاء مصابة بقع موضعية شاحبة (Chlorotic) بعد 10 أيام من العدوى اعقبها ظهور اصفرار غير منتظم حول العروق وتشوه الأوراق بعد اسبوعين من العدوى، وقد اشارت دراسات سابقة إلى استجابة نبات الزربيج لفايروس موزائيك الفاصوليا الأصفر بتكوين بقع صفراء على الاوراق المعدة (شكل 3).



شكل 3. أعراض البقع الموضعية على أوراق نبات الزربيج

Chenopodium amaranticolor الملغحة بمستخلص نبات

الباقلاء مصاب بفايروس (1) وتلاحظ ورقة سليمة

للمقارنة (2)

عزل وتشخيص بكتيريا الرايزوبيا

ظهرت مستعمرات بيضاء كريمية اللون، عند زراعة مستخلص العقد البكتيرية المأخوذة من جذور نباتات باقلاء

لتحديد اختزال عدد البقع المرضية المنتخرة على أوراق نبات التبغ صنف Samsun المنسببة عن الإصابة بفيروس TMV فكانت نسبة الإصابة في النباتات المعاملة 69.7% قياساً بـ 99.5% في النباتات غير المعاملة. إن ميكانيكية تحفيز المقاومة في النبات بواسطة البكتريا غير المرصدة قد تعود إلى مكونات الجدار الخلوي البكتيري من المواد الكاربوهيدراتية والدهنية، وقد اشير إلى أن مركبات Lipopolysaccharide (LPS) في بكتريا *P.f* وأن المواد الكاربوهيدراتية Eipopolysaccharide (EPS) السطحية و LPS في الرايزوبيا مسؤولة عن تحفيز المقاومة الجهازية في نبات القرنفل ضد الفطر *Fusarium spp* المسبب للذبول (23). اشار Raupach وآخرون (18) إلى أن معاملة بذور الخيار والطماطة ببكتريا محسنة لنمو النبات والتي اثبتت كفاءتها في تحفيز المقاومة الجهازية في النباتات ضد الأمراض الفطرية والبكتيرية اظهرت كفاءة في تحفيز المقاومة الجهازية في نبات الخيار والطماطة ضد الإصابة بفيروس موزايك الخيار (CMV) *Cucumber mosaic cucumovirus*.

جدول 2. استجابة نبات الباقلاء الناتجة من بذور معاملة

بالبكتريا *P. fluorescens* و *R. leguminosarum*

للعدوى بفيروس موزايك الفاصولياء الأصفر (BYMV)

المعاملة	نسبة الإصابة %	مقدار الامتصاص	نسبة التثبيط %
T1	صفر	0.048	91.4
T2	صفر	0.048	91.4
T3	صفر	0.048	91.4
T4	26	0.225	59.75
T5	25	0.240	57.0
T6	20	0.150	72.0
T7	92	0.558	صفر
T8	صفر	0.048	91.4
L.S.D 5%	12.583	0.175	14.533

اشارت النتائج جدول 3 إلى أن استعمال خليط من البكتريا *P.f* و *R.l* أدى إلى زيادة كفاءة البكتيريا في تثبيط تضاعف الفيروس وهذا ناجم عن أن استعمال أكثر من عامل استحثاث بآليات مختلفة أدى إلى زيادة كفاءة الاستحثاث ضد الفيروس، ووجد أن معاملة بذور التبغ بمعلق البكتيريا *P.f* أدت إلى استحثاث المقاومة الجهازية في نبات التبغ ضد فيروس تنخر التبغ TNV والتي أدت إلى اختزال عدد البقع المرضية في النباتات الناتجة من بذور معاملة (14)،

اختبار ELISA على الطول الموجي 405 نانوميتر، وبلغ مقدار الامتصاص للمعاملتين 0.225 و 0.240 وبنسبة تثبيط 59.75 و 57.00% بالتتابع قياساً بمعاملة المقارنة والمعدة بالفايروس فقط والتي بلغ مقدار الامتصاص فيها 0.558 وبنسبة تثبيط صفر، كما سببت المعاملة بخليط من نوعي البكتريا *P.f* و *R.l* خفضاً معنوياً إضافياً في نسبة الإصابة مقارنة بمعاملي البكتريا على انفراد وبلغت نسبة الإصابة 20% كما أدت إلى خفض إضافي في تركيز الفايروس في الأوراق المصابة إذ بلغ مقدار الامتصاص في اختبار اليزا 0.150 وبنسبة تثبيط 72.00%. تشير النتائج في جدول 2 إلى أن معاملة بذور الباقلاء بالبكتريا *P.f* و *R.l* بشكل مفرد أو بخليط منهما أدت إلى خفض معنوي في نسبة الإصابة بفيروس موزايك الفاصولياء الأصفر وتركيز الفايروس في النبات، ولم يوجد تلامس مباشر بين الفايروس في الأجزاء العلوية من النبات والبكتريا في التربة وبذلك لا يوجد أثر مباشر للبكتريا على الفايروس وأن التأثير في الفايروس هو تأثير غير مباشر من خلال تحفيز البكتريا أو منتجاتها الايضية أليات الدفاع في النبات (استحثاث مقاومة جهازية). إن تحفيز المقاومة الجهازية في النبات ناجم عن تنشيط جينات في النبات مسؤولة عن تصنيع بروتينات قد تؤثر مباشرة كعوامل مضادة للفايروس أو بشكل غير مباشر من خلال تحفيز جينات أخرى في النبات تؤدي في النهاية إلى استحثاث مقاومة جهازية في النبات ضد الفايروس، إذ تعمل هذه البروتينات على تثبيط تضاعف الحامض النووي وإيقاف تصنيع بروتينات الفايروس، وقد اشارت عدة دراسات سابقة إلى ان معاملة النباتات بعوامل حيوية أو غير حيوية أدت إلى تحفيز مقاومة بالنبات ضد اصابات لاحقة بالفايروس نفسه أو فايروسات اخرى (25)، وقد استعملت البكتريا المعزولة من المنطقة المحيطة بجذور النباتات بشكل واسع لتحفيز المقاومة في الأجزاء العلوية من النبات ضد طيف واسع من المسببات المرضية في عدة انواع نباتية (16)، (22). يؤدي استحثاث المقاومة في النبات إلى تثبيط تضاعف الفايروس وإيقاف تطور الأعراض الفايروسية على النباتات المعدة (اختزال حجم البقع أو تقليل عددها على الأوراق مقارنة بالنباتات غير المستحثة والمعدة بالفايروس نفسه) (9). استخدم Yang وآخرون (26) السلالة البكتيرية *P.f* (CZ)

جدول 3. تأثير تغطية بذور الباقلاء بالبكتريا *R.l* و *P.f* وخليط منهما والعدوى بالفايروس في معايير النمو للنبات

بعد 50 يوما

المعاملة	ارتفاع النبات (سم)	الوزن الطري (غم) للنبات الواحد		الوزن الجاف (غم) للنبات الواحد	
		مجموع خضري	جذور	مجموع خضري	جذور
T1	60	215.25	121	19.56	36.75
T2	65	226.25	128.75	20.38	38.09
T3	74	260.25	130.30	21.93	42.51
T4	58	150.25	75.25	14.23	27.68
T5	68	158.33	79.25	16.1	29.14
T6	70	242.14	125.00	20.5	40.18
T7	25	118	72.25	13.85	19.21
T8	55	207.21	114.25	16.33	33.43
LSD 5%	8	24.78	15.31	4.30	7.26

يلاحظ من النتائج ان معاملة بذور نباتات الباقلاء بالبكتريا المحفزة لنمو النبات (PGPR) والعدوى بالفايروس ادت إلى تحسين معنوي في معايير نمو النبات وكان التأثير الاكبر للرايزوبيا والخليط البكتيري، وأن هذا التحسين في معايير النمو في النباتات المعاملة ربما يعود إلى التأثير المباشر للبكتريا في الكائنات الممرضة للنبات في التربة (الفطر والبكتريا) أو غير مباشر من خلال تحفيز المقاومة الجهازية في النبات ضد الفايروس والتي ادت إلى تثبيط تضاعف الفايروس وتحسين معايير النمو مقارنة بالنباتات غير المعاملة والمعدة بالفايروس، وقد اشارت عدة دراسات إلى وجود أعداد كبيرة من البكتيريا المفيدة والمحفزة لنمو النبات في التربة حول الجذور وعلى أسطح الجذور ومنها البكتيريا التي تم عزلها من هذه المناطق *P.spp*، والتي اثبتت الدراسات كفاءتها في تحسين نمو النبات من خلال تثبيطها لنمو وتكاثر المسببات المرضية (17). إن تأثير البكتريا المحفزة لنمو النبات ضد المسببات المرضية في التربة قد ينجم عن التنافس على المواد الغذائية وإنتاج Siderophores المتميز بوزنه الجزيئي الواطئ الذي يخلب الحديد والتضاد مع المسببات المرضية وإفراز انزيمات محللة (21)، وقد اشارت عدة دراسات إلى أن وجود بعض الأنواع البكتيرية في المناطق المحيطة بجذور النباتات يمكن ان تحسن نمو النبات بشكل مباشر من خلال تحريرها لمركبات أيضية ثانوية تجعل بعض العناصر الغذائية أكثر جاهزية للامتصاص من جذور النباتات أو بشكل غير مباشر من خلال تحفيزها المقاومة الجهازية في النبات ضد المسببات المرضية (فطر وبكتيريا

وتوصل Zehnder وآخرون (28) إلى تشخيص سلالة من PGPR اثبتت كفاءة في حماية نباتات الطماطة من الإصابة بفايروس موزايك الخيار (CMV) تحت ظروف البيت الزجاجي.

تأثير بكتريا *R.l* و *P.f* في معايير النمو

اظهرت النتائج الموضحة في جدول 3 أن الفايروس سبب خفضا كبيرا في معايير النمو جميعها قياسا بمعاملة المقارنة المتمثلة بالنبات السليم، وأن معاملة البذور بالبكتريا *R.l* و *P.f* أو خليط منهما ادت إلى تحسين معنوي في معايير النمو لنبات الباقلاء الناتجة من هذه البذور قياسا بالنباتات غير المعاملة بالبكتريا من حيث ارتفاع النبات والوزن الطري والجاف للمجموعين الجذري والخضري، اذ بلغ معدل ارتفاع النباتات الناتجة من بذور معاملة بالبكتريا *R.l* و *P.f* وخليط منهما 60 و 65 و 74 سم والوزن الطري للمجموع الجذري 121.00 و 128.75 و 130.30 غم/نبات والوزن الطري للمجموع الخضري 215.25 و 226.25 و 260.25 غم/نبات و 90.50 و 156.75 و 165.60 عقدة/نبات، والوزن الجاف للمجموع الجذري 19.56 و 20.38 و 21.93 والوزن الجاف للمجموع الخضري 36.75 و 38.09 و 42.51 بالتتابع قياسا بـ 25 سم و 72.21 و 118 و 13.85 و 19.21 غم/نبات في النباتات المعدة بالفايروس فقط وغير معاملة بالبكتريا وقياسا بـ 55 سم و 114.25 و 207.21 و 16.33 و 33.43 غم/نبات بالتتابع في النباتات السليمة (غير معاملة وغير معدة) وادت المعاملة بالبكتريا بشكل مفرد او خليط منهما إلى زيادة في أطوال النباتات والوزن الطري للمجموع الجذري والخضري اذ بلغت اطوال النباتات 58 و 68 و 70 سم والوزن الطري للجذور 75.25 و 79.25 و 125 غم/نبات والوزن الطري للمجموع الخضري 150.25 و 158.33 و 242.14 غم/نبات والوزن الجاف للمجموع الجذري 14.23 و 16.1 و 20.5 والوزن الجاف للمجموع الخضري 27.68 و 29.14 و 40.18 غم/نبات بالتتابع قياسا بمعاملة المقارنة التي بلغت 25 سم و 72.25 و 118 و 13.85 و 19.21 غم/نبات في النباتات المعدة بالفايروس فقط وقياسا بـ 55 سم و 114.25 و 207.21 و 16.33 و 33.43 غم/نبات بالتتابع في النباتات السليمة (غير معاملة وغير معدة).

الزجاجي باستخدام أربع سلالات من البكتريا *Bacillus sp* هي *B.amyloliquefaciens* و *B.pumilus* (SE34) و *IN937a* و *B.subtilis* (IN937b) و *Kluyvera* و *cryocrescens* (INI4) في معاملة تغطية البذور والتي ادت إلى زيادة معنوية في الحاصل وخفض نسبة الإصابة إلى 58.32% قياسا بـ 98.88% في النباتات غير المعاملة، وحصلوا على نتائج مماثلة ضد فايروس تبرقش الطماطة (TOMOV) Tomato mottle virus، ووجد أن خلط أكثر من عامل حيوي كان أكثر كفاءة في تحسين نمو النبات وزيادة محتواه من الكلوروفيل والنايتروجين والفسفور والبيوتاسيوم فضلا عن تقليل الإصابة بديدان العقد الجذرية وتعفن الجذور (20)، وادى استعمال خليط حيوي من EM ضد الفطر *Pythium aphanidermatum* و *Rhizoctonia solani* في الوسط الزراعي وتحت ظروف البيت الزجاجي إلى تثبيط عالي لنمو الفطرين (3). إن البكتريا المثبتة للنايتروجين *Rhizobium* لها المقدرة على خفض حساسية نباتات الجت للإصابة الفايروسية. ادى استعمال بكتريا *P.f* إلى تحفيز المقاومة الجهازية في نباتات الخيار ضد فايروس موزائيك الخيار CMV سواء بمعاملة تغطية البذور أو تبليل التربة أو الرش على الأوراق الفلجية بمعلق البكتريا وعند متابعة تضاعف الفايروس في النباتات المعاملة باختبار اليزا وجد أن معاملة تغطية البذور بالبكتريا اعطت أعلى نسبة للتثبيط (1). استخدم Kumar وآخرون (11) بكتريا *P.f* في اختزال نسبة الإصابة في نباتات الفاصوليا بفايروس Bean common mosaic potyvirus عند تغطية بذور الفاصوليا لمدة 12 ساعة بمعلق البكتريا اذ بلغت نسبة الإصابة 10% في النباتات المعاملة قياسا بـ 53% في النباتات غير المعاملة تحت ظروف البيت الزجاجي. تشير الدراسات التي بحثت في استحثاث المقاومة الجهازية في النبات إلى استحثاث المقاومة يرافقها الكثير من التغيرات في النبات والتي شملت انتاج مركبات مضادة للفايروسات وبروتينات ومن بين البروتينات التي تنتجها النباتات عدد من الانزيمات منها أنزيم IPeroxidase (POD) وأنزيم Phenyl alanine amonialyase (PAL)، إذ استعملت هذه الأنزيمات دليلا لاستحثاث المقاومة الجهازية في النباتات المعاملة بمعلق *P.f* والبكتريا *R.I* والمعدة بفايروس الموزائيك

وفايروس (29). إن تحسين نمو النباتات الناتجة من بذور معاملة بالرايزوبيا يعود بشكل رئيس إلى تثبيتها النيتروجين الجوي فضلا عن تحريرها لمركبات أيض ثانوية بضمنها منظمات نمو واذابتها لعنصر الفسفور وجعله جاهزا للامتصاص وعناصر أخرى حول الجذور (19). لا يستبعد أيضا أن يكون تأثير الرايزوبيا في تحسين معايير النمو في النباتات الناتجة من بذور معاملة بالبكتريا نتيجة تأثيرها في مسببات وأمراض النبات وهذا قد يكون مباشرا في المسببات المرضية أو غير مباشر من خلال تنشيطها لأليات الدفاع في النباتات، وقد اشير إلى أن الرايزوبيا تنتج مركبات تؤثر في المسببات المرضية مباشرة (10)، كما ذكر أنها تنتج موادا مخيلية Siderophores تعمل على خلب الحديد وجعله غير متوفر للمسبب المرضي (4)، وقد اثبتت دراسات أخرى أن التأثير غير المباشر للرايزوبيا هو تنشيط وسائل الدفاع الذاتية في النبات عند تعرضها للمسبب المرضي من خلال إنتاجها عددا من المركبات من ضمنها مركبات فينولية وفلافونويدات (Flavonoids) وفابيتوكسينات وبروتينات في عوائل نباتية متعددة (15). هذه النتائج تشير إلى إمكانية استعمال خليط من البكتريا يضم الرايزوبيا لتحسين نمو النبات وتحفيز المقاومة الجهازية فيها وربما تمثل الرايزوبيا مع البكتريا المحسنة لنمو النبات وسيلة داعمة في إدارة أمراض النبات الفايروسية كونها تقدم وسيلة سهلة وأمنة واقتصادية، وقد اشارت عدة دراسات إلى كفاءة مخاليط الاحياء المجهرية في مقاومة المسببات المرضية إذ ادى رش أشجار الموز بخليط من أحياء مجهرية اطلق عليها Effective Microorganisms (EM) إلى حمايتها من الإصابة بمرض Black sigatoka الذي يسببه الفطر *Mycosphaerella fijiensis* (7)، واطهر الخليط الحيوي Effective Microorganisms (EM) فعالية مساوية لفعالية مبيد بافستين في حماية محصول فول الصويا من الإصابة بالفطر *Rhizoctonia solani* (24)، وادى تغطية بذور الكتان بمستحضر EM إلى الحد من مرض الذبول الفيوزارمي المتسبب عن الفطر *Fusarium oxysporum* (12)، وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره Zehnder وآخرون (27) في استحثاث المقاومة الجهازية في نبات الطماطة ضد فايروس CMV في ظروف البيت

8. Graham, P. H., and C. P. Vance. 2003. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*. 131: 872-877.
9. Hammerschmidt, R. 1999. Induced disease resistance: How do induced plants stop pathogens?. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 55: 77-84.
10. Kacem, M, K. Fadhila and B. Abdelkader. 2009. Antimicrobial activities of *Rhizobium* sp. strains against *Pseudomonas savastanoi*, the agent responsible for the olive knor disease in Algeria. *Grasasy Aceites*. 60(2): 139-146.
11. Kumar, H. B., A. C. Shankar, H. S. Prakash and S. Shetty. 2005. Effect of sanosil and *Pseudomonas fluorescens* on bean common mosaic potyvirus incidence in French bean. *International J. Bot.* 1(2): 163-167.
12. Langner, K. and A. Andruszewska. 2004. Efficacy of biological control of flax fusarium wilt. *Acta fytotechnice et zootechnica*. 7: 167-169.
13. Makkouk, K. M., L. Bos, O. I. Azzam, S. Kumari and A. Rizkallah. 1988. Survey of viruses affecting faba bean in six Arab countries. *Arab J. Plant Protection*. 6: 53-61.
14. Maurhofer, M., C. Hase, P. Meuwly, J. P. Metraux and G. Defago. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: Influence of the *gac* Agene and of pyoverdine production. *Phytopathology*. 84: 139-146.
15. Mishra, R. P., R. K. Singh, H. K. Jaiswal, V. Kumar and S. Maurya. 2006. Rhizobium mediated Induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). *Curr. Microbiol.* 52: 383-389.
16. Pieterse, C. M., S. C. Van wees, J. Ton, J. A. Van Pelt, and L. C. Van Loon. 2002. Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* 4: 535-544.
17. Pieterse, C. M. and L. C. Van Loon. 2007. Signalling cascades involved in induced resistance. in *Induced Resistance for Plant Disease Control: A Sustainable Approach to Crop Protection*. D. Walters, A. Newton and G. Lyon (Eds.). Oxford, Blackwell, UK. p. 65-88.
18. Raupach, G. S., L. Liu, J. F. Murphy, S. Tuzun and J. W. Kloepper. 1996. Induced

الفاصولياء الأصفر، وهذه النتائج تتفق مع ما وجدته Al-Ani و Adhab (2) من أن تعطيس بذور البطيخ بالمعلق البكتيري *P.f* لمدة 24 ساعة ثم العدوى بعصير النبات المصاب بفايروس CMV في مرحلة الأوراق الفلجية أعطى أعلى نسبة منع لتضاعف الفايروس بلغت 86.55% في حين اعطت معاملة تبديل التربة 74.14%. يلاحظ من هذه النتائج أن المعاملة بطريقة تعطيس البذور بمعلق البكتيريا المحفزة لنمو النبات PGPR اعطت اعلى نسبة تثبيط لتضاعف الفايروس.

المصادر

1. Al- Ani, R. R. 2011. Identification strains of bean yellow virus potyvirus (BYMV) on bean *Phaseolus vulgaris*. *Biotechnology Res. Center, Al-Nahrain Univ.* 1(5): 5-13.
2. Al-Ani, A. and M. A. Adhab. 2012. Protection of melon plants against Cucumber mosaic virus infection using *Pseudomonas fluorescens* biofertilizer. *Afric. J. Biotechnology*. 11: 16579-16585.
3. Aljarah, N. S. A and R. A. H Alani. 2012. Activity of effective microorganism's and fermented plant extract against causative agents of cucumber seedling damping off. *The Iraqi J. Agric. Sci.* 43(2): 55-66.
4. Arora, S., A. K. Chopra, N. Joshi and G. Prasad. 2005. Physicochemical and bacteriological characteristics of Aachal dairt mill effluent and its effects on seed germination of some agricultural crops. *Nature Environment and Pollution Technol.* 4: 441-444.
5. Beck, D. P., L. A. Materon and F. Afandi. 1993. *Practical Rhizobium Legume Technology Manual Technical ICARDA, Syria*. No. 19.
6. Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the micro-plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Plant viruses. *J. Gen. Virolo.* 34: 475-483.
7. Elango, F., P. Taboral and J. M. Vega. 1997. Control of black sigatoka disease (*Mycosphaerella fijiensis*) using effective microorganisms. *Proceedings of the 5th International Conference on Kyusei Nature Farming. of Plant Diseases and Protection*, 113 (6): 247-256.

- systemic resistance in cucumber and tomato against Cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant Dis.* 80: 891-894.
19. Saharn, B. S. and V. Nehra. 2011. Plant growth promoting Rhizobacteria: A critical review. *Life Sciences and Medicine Res.* 21: 1-30.
20. Siddiqui, Z. A. and M. Sakhtar. 2007. Biocontrol of a chickpea root-rot disease complex with phosphate-solubilizing Microorganisms. *J. Plant Pathology.* 89: 67-77.
21. Validov, S., O. Marrodi, L. Delafuente, A. Boronin, D. Weller, S. Thoma and D. Mavrodi. 2005. Antagonistic activity among 2,4-diacetyl phloroglucinol producing *fluorescens Pseudomonads* sp. *Microbiology.* 11: 242-249.
22. Van Loon, L. C., P. A. Bakker and C. M. J. Pieterse, 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Ann. Rev. Phytopathology.* 36: 453-483.
23. Van Peer, R., G. J. Niemann and B. Schippers. 1991. Induced resistance and Phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81: 728-734.
24. Vantuat, N. and L. Vantrinh. 2001. Role of Effective Microbes in Integrated Pest Management Programs in Vietnam. 7th International Conference on Kyusei Nature Farming.
25. Walters, D. R., D. Walsh, A. C. Newton and G. D. Lyon, 2005. Induced resistance for plant disease control: Maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology.* 95: 1368-1373.
26. Yang, J., C. Guo, X. Zhai, L. Shen, Y. Qian and F. Wang. 2012. Inactivation of tobacco mosaic virus in soil by *Pseudomonas putida* A3-m strain to prevent virus mosaic disease. *Afric. J. of Microbiol., Res.* 6(33): 6300- 6307
27. Zehander, G. W. G. Yao. G. Wei and J. W. Kloepper. 2000. Induction of resistance in tomato against cucumber mosaic cucumovirus by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol.* 45: 127-137.
28. Zehnder, G. W., C. Yao, J. F. Murphy, E. R. Sikora, J. W. Kloepper, D. J. Schuster and J. E. Polston. 1999. Microbe-induced resistance against pathogens and herbivores Evidence of effectiveness in agriculture. in: *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores: Biochemistry Ecology, and Agriculture.* A. A. Agrawal, S. Tuzun and E. Bent (eds.). American Phytopathological Soc. p. 335-355
29. Zehnder, G., J. Murphy, E. Sikora and J. Kloepper. 2001. Application of rhizobacteria for induced resistance. *European J. Plant Pathology.* 107: 39-50.